

Université de Montréal

Nouvelles approches thérapeutiques pour la dysfonction endothéliale et
l'hypertension pulmonaire secondaire à la circulation extracorporelle chez le
porc

Par

Yoan Lamarche, MD

Département de Chirurgie
Institut de Cardiologie de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences biomédicales

Janvier 2004

© Yoan Lamarche 2003



W

4

U58

2004

V. 063

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Nouvelles approches thérapeutiques pour la dysfonction endothéliale et
l'hypertension pulmonaire secondaire à la circulation extracorporelle chez le
porc

Présenté par

Yoan Lamarche, MD

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gilbert Blaise

Président du jury

Dr Louis P. Perrault

Directeur de recherche

Philippe Demers

Rapporteur

Résumé anglais

The use of cardiopulmonary bypass causes pulmonary arterial endothelial dysfunction leading to pulmonary hypertension. The aim of this project is to prevent pulmonary arterial endothelial dysfunction by preoperative administration of inhaled prostacyclin, intravenous sildenafil, inhaled and intravenous milrinone.

Two different substudies were undertaken. In the first, four groups of swine were compared: 1-Control 2-Cardiopulmonary Bypass (CPB) 3-CPB with inhaled prostacyclin 4- CPB and intravenous sildenafil. After 90 minutes of CPB and 60 minutes of reperfusion, pulmonary arteries endothelium dependent relaxations to acetylcholine and bradykinine were studied in organ chambers. CPB decreased the amplitude of the relaxations to acetylcholine. Sildenafil prevented that decrease. Inhaled prostacyclin increased the amplitude of the relaxations to bradykinin, which were unaltered by CPB.

In the second substudy, four groups of swine were compared: 1-Control 2-Cardiopulmonary Bypass (CPB) 3-CPB with inhaled milrinone 4- CPB and intravenous milrinone. Hemodynamic and oxygenation parameters were recorded throughout the experiment. After 90 minutes of CPB and 60 minutes of reperfusion, pulmonary arterial endothelium-dependent relaxations to acetylcholine and bradykinine were studied in organ chamber experiments. Inhaled milrinone lowered the heart rate and increased the cardiac output without lowering the systemic arterial pressure and completely prevented the decrease in endothelium-dependent relaxations to acetylcholine. Intravenous milrinone induced hypotension, tachycardia and did not prevent endothelial dysfunction.

Intravenous sildenafil, inhaled milrinone and inhaled prostacyclin prevent pulmonary arterial endothelial dysfunction following CPB. Inhaled milrinone has a safe hemodynamic and oxygenation profile in vivo.

Key words: Cardiopulmonary Bypass, endothelial dysfunction, prostacyclin, sildenafil, inhaled milrinone

Résumé français

La circulation extracorporelle (CEC) cause une dysfonction endothéliale artérielle pulmonaire pouvant mener à l'hypertension pulmonaire. Le but de cette étude est de prévenir cette dysfonction endothéliale par l'administration préopératoire de prostacycline inhalée, de sildenafil intraveineux et de milrinone inhalée et intraveineuse.

Deux sous-études ont été réalisées :

A) Quatre groupes de porcs: 1- Contrôles 2-CEC 3-CEC et prostacycline inhalée 4-CEC et sildenafil intraveineux. Après 90 minutes de CEC et 60 minutes de reperfusion, les relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine et à la bradykinine des artères pulmonaires furent évaluées en chambres d'organe. La CEC diminuait l'amplitude des relaxations à l'acétylcholine alors qu'elle influençait peu celles à la bradykinine. La prostacycline augmentait les relaxations à la bradykinine et le sildenafil empêchait l'altération des relaxations à l'acétylcholine.

B) Quatre groupes de porcs: 1- Contrôles 2-CEC 3-CEC et milrinone inhalée 4-CEC et milrinone intraveineuse. Les paramètres hémodynamiques et d'oxygénation furent mesurés au cours de l'opération. Après 90 minutes de CEC et 60 minutes de reperfusion, les relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine et à la bradykinine des artères pulmonaires furent évaluées en chambres d'organe. La milrinone inhalée entraînait une diminution de la fréquence cardiaque et une hausse du débit cardiaque tout en prévenant l'altération des relaxation dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine. La milrinone intraveineuse entraînait de l'hypotension et de la tachycardie et ne prévenait pas le développement de dysfonction endothéliale.

Le sildenafil intraveineux, la milrinone inhalée et la prostacycline inhalée préviennent la dysfonction endothéliale pulmonaire après la CEC.

Mots clés: dysfonction endothéliale, circulation extracorporelle, prostacycline, sildenafil, milrinone inhalée

Table des matières

Page de titre	i
Identification du Jury	ii
Résumé anglais	iii
Résumé Français	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xii
Corps de la thèse	1
Chapitre I	1
Introduction	1
Chapitre II	49
Hypothèses et buts	50
Chapitre III	51
Premier article:	52
Intravenous sildenafil prevents the pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass	
Deuxième article:	72
Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following cardiopulmonary bypass	

Chapitre IV	102
Discussion des résultats	103
Chapitre V	108
Conclusion	109
Sources documentaires	110

Liste des tableaux

Premier article

Table 1:

Contractile responses to a depolarizing physiological solution containing 60 mM KCl and concentration of PE required to achieve 50% of KCl-induced contraction of pulmonary arteries isolated from control pigs (n=6) and pigs that underwent CPB (n=6) with or without previous inhaled prostacyclin (n=6) or intravenous sildenafil(n=6). Data expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ sildenafil vs CPB.

Deuxième article

Table 1:

Contractile responses to a depolarizing physiological solution containing 60 mM KCl and concentration of PE required to achieve 50% of KCl-induced contraction of pulmonary arteries isolated from control pigs (n=6) and pigs that underwent CPB (n=6) with or without previous inhaled (n=3) or intravenous (n=3) administration of milrinone. Data expressed as mean \pm SD * $p < 0.01$ vs intravenous milrinone ** $p < 0.05$ vs control.

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Substances sécrétées par la cellule endothéliale

(From ¹)

Figure 2: Voie de synthèse du monoxyde d'azote et mécanisme d'action.

(Schéma réalisé par le service d'audiovisuel de l'Institut de Cardiologie de Montréal)

Figure 3: Récepteurs endothéliaux menant à la sécrétion de facteurs vasorelaxants

(From ¹)

Figure 4: Mécanismes menant à la relaxation du muscle vasculaire lisse

(From ¹)

Figure 5: Formation de l'endothéline et facteurs d'influence

(From: Vanhoutte P. Say NO et ET. J Auton Nerv Syst 2000; 81:571-577)

Figure 6: Récepteurs de l'endothéline et effets respectifs

(From: Vanhoutte P. Say NO et ET. J Auton Nerv Syst 2000; 81:571-577)

Figure 7: Circuit de circulation extracorporelle

(Schéma réalisé par Louis-Mathieu Stevens, MD)

Chapitre 3

Premier article

Figure 1:

Rings of porcine pulmonary artery with endothelium. X-axis: Log ACh (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ Control vs CPB, ** $p < 0,05$ Control vs PGI₂, *** $p < 0,05$ CPB vs PGI₂, \$ $p < 0,05$ Control vs Sildenafil, & $p < 0,05$ CPB vs Sildenafil, # $p < 0,05$ PGI₂ vs Sildenafil.

Figure 2:

Rings of porcine pulmonary artery with endothelium. X-axis: Log BK (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ Control vs CPB, ** $p < 0,05$ Control vs PGI₂, *** $p < 0,05$ CPB vs PGI₂, \$ $p < 0,05$ Control vs Sildenafil, & $p < 0,05$ CPB vs Sildenafil, # $p < 0,05$ PGI₂ vs Sildenafil.

Deuxième article

Figure 1:

Schematic representation of an endothelial cell and a smooth muscle cell. ACh: acetylcholine. BK: bradykinin. PGI₂: prostacyclin. cAMP: cyclic adenosine monophosphate. cGMP: cyclic guanosin monophosphate. (Schéma réalisé par le service d'audiovisuel de l'Institut de Cardiologie de Montréal)

Figure 2:

Mean arterial pressure. X-axis: time, y-axis: MAP (mmHg). Data expressed as mean \pm SEM *: $p < 0,05$ CPB vs Milrinone (both groups).

Figure 3 :

Cardiac index. X-axis: time, y-axis: CI (l/min/m²). Data expressed as mean \pm SEM. *: $p < 0.01$ CPB vs milrinone (both groups).

Figure 4:

Heart rate. X-axis: time, y-axis: HR (bpm). Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ CPB vs Inhaled Milrinone, ** $p < 0.01$ CPB vs Inhaled Milrinone, *** $p < 0.001$ CPB vs Inhaled Milrinone, + $p < 0.05$ Inhaled vs IV Milrinone, ++ $p < 0.01$ Inhaled vs IV Milrinone, +++ $p < 0.001$ Inhaled vs IV Milrinone, # $p < 0.05$ CPB vs IV Milrinone.

Figure 5:

Alveolo-arterial oxygen gradient. X-axis: time, y-axis: AaDO₂ (mmHg). Data expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.01$ IV Milrinone vs inhaled Milrinone et CPB.

Liste des sigles et des Abréviations

AaDO ₂ :	Gradient alvéolo-artériel en oxygène
ACh :	Acetylcholine
ACT:	Activated clotting time
ADP:	Adénosine diphosphate
AMPc:	Adénosine monophosphate Cyclique
ANA :	Antinuclear Antibodies
ANOVA :	Analysis of Variance
ARDS :	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP:	Adenosine triphosphate
BH ₄ :	Tetrahydrobioptérine
BK:	Bradykinin
CaCl ₂ :	Calcium Chloride
cAMP:	Cyclic adenosine monophosphate
CEC:	Circulation extra-corporelle
cGMP:	Cyclic Guanosine monophosphate
CHF:	Congestive heart failure
CI:	Cardiac index
CPAP:	Continuous positive airway pressure
CPB:	Cardiopulmonary Bypass
DAG:	Diacylglycerol
EDCF:	Endothelium Derived Contracting Factor
EDHF:	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF:	Endothelium Derived Relaxing Factor
EKG:	Electrocardiogram
eNOS (NOS3):	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ET-1:	Endothelin-1
FAD:	Flavine Adenosine Diphosphate
FiO ₂ :	Fraction inspirée en oxygène
FMN:	Flavine Monophosphate
FR:	French
g:	Gramme
Gi Protein:	Gi binding protein (GTPase binding protein)
GMPC:	Guanosine monophosphate Cyclique
Gq Protein:	Gq binding protein
HF:	Heart Failure
HR:	Heart rate
H ₂ O ₂ :	Hydrogen Peroxide
HTAP:	Hypertension artérielle pulmonaire
HTP:	Hypertension pulmonaire
IL-6:	Interleukine 6
IL-8:	Interleukine 8
INH:	Inhaled
iNOS (NOS2):	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP ₃ :	Inositol Triphosphate

IV:	Intravenous
KCl:	Potassium Chloride
Kg:	Kilogramme
KH ₂ PO ₄ :	Potassium phosphate monobasic
L-NMMA:	L-N-monométhyl-L-Arginine
L-NAME:	L-N-nitro-L-Arginine
LR:	Lactate Ringer
LV:	Left Ventricle
M:	Muscarinic
MAP:	Mean arterial pressure
MDA:	Malondialdéhyde
MgSO ₄ :	Magnesium Sulfate
MIL:	Milrinone
mmHg:	millimètre de mercure
NaCl:	Sodium Chloride
NaHCO ₃ :	Sodium Bicarbonate
NADPH:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
nNOS(NOS1):	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO:	Nitric oxide (monoxyde d'azote)
NOS:	Nitric Oxide Synthase
O ₂ ⁻ :	Superoxide Anion
OH ⁻ :	Hydroxyl
PAF:	Platelet aggregating factor
PaO ₂ :	Pression partielle artérielle en oxygène
PAPm:	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PaCO ₂ :	Pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
PDE ₃₋₅ :	Phosphodiesterase 3-5
PE:	Phenylephrine
PEEP:	Positive end-expiratory pressure
PGE ₁ :	Prostaglandin E1
PGF _{2α} :	Prostaglandin F _{2α}
PGH ₂ :	Prostaglandin H2
PGI ₂ :	Prostaglandin I2; Prostacyclin
PGs:	Prostaglandins
PH:	Pulmonary hypertension
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PPH:	Primary Pulmonary Hypertension
PVR:	Pulmonary Vascular Resistance
Q:	Débit cardiaque
ROS:	Reactive oxygen species
RV:	Right Ventricle
RVP:	Résistance vasculaire pulmonaire
SD:	Standard deviation
SEM:	Standard error of the mean
SIRS:	Systemic inflammatory response syndrome
SLE:	Systemic Lupus Erythematosis

SMC:	Smooth muscle cell
SNP:	Sodium Nitroprusside
SPH:	Secondary Pulmonary Hypertension
TNF α :	Tumor Necrosis factor α
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
UI:	Unité Internationale
VD:	Ventricule droit
VG:	Ventricule gauche
V/Q:	Ventilation-perfusion
VIH:	Virus immunodeficiency humain
w:	Wedge (pression capillaire pulmonaire bloquée)

Chapitre I

INTRODUCTION

L'endothélium

L'endothélium est composé d'une seule couche cellulaire et sépare le compartiment intravasculaire du compartiment extravasculaire. De par sa position, l'endothélium est voué à plusieurs rôles dont les principaux sont le maintien d'une surface non-thrombogène, la perméabilité sélective aux molécules et aux cellules circulantes et le métabolisme de certaines substances comme la norépinéphrine et les prostanoïdes. Cette perméabilité sélective permet un passage de métabolites et d'hormones, de façon passive ou active. L'endothélium peut aussi faciliter ou limiter l'adhérence et la migration de certaines cellules comme les neutrophiles et a aussi une fonction régulatrice sur la prolifération du muscle lisse sous-jacent et sur le tonus vasomoteur des vaisseaux ¹. Sa position le rend aussi vulnérable aux agressions de nombreux agents qui peuvent ainsi le rendre dysfonctionnel. Certains agresseurs, comme le diabète, le tabagisme, l'hyperlipidémie et l'hypertension sont bien connus comme altérant la fonction endothéliale. L'exposition à la circulation extracorporelle (CEC) entraîne également une dysfonction endothéliale.

La circulation extracorporelle est utilisée principalement en chirurgie cardiaque, mais aussi dans certaines autres spécialités². Elle permet de dévier le sang hors du circuit cardiopulmonaire et d'accomplir la fonction du coeur et des poumons à l'aide d'une pompe et d'un oxygénateur. Malheureusement, le contact du sang avec les surfaces non-biologiques du circuit de CEC entraîne une activation des éléments figurés du sang et une cascade inflammatoire qui

se répercute au niveau systémique chez le patient. Cette cascade inflammatoire entraîne une dysfonction de plusieurs organes dont le cœur et les poumons. On croit que l'endothélium joue un rôle important comme médiateur de cette dysfonction systémique en général et au niveau pulmonaire en particulier.

Nous exposerons donc dans un premier temps la physiologie de base de l'endothélium sain puis dysfonctionnel pour ensuite décrire sa réaction lors de l'utilisation de circulation extracorporelle. La dysfonction de l'endothélium vasculaire pulmonaire et ses manifestations seront ensuite expliquées et nous explorerons différentes stratégies pour améliorer la fonction pulmonaire dans la période qui suit la chirurgie sous circulation extracorporelle.

Physiologie endothéliale normale

La cellule endothéliale saine joue un rôle important dans son environnement immédiat en sécrétant une variété de substances (Figure 1). Ces substances jouent des rôles importants dans le maintien du tonus vasculaire, la modulation de la coagulation et le contrôle de la prolifération du tissu environnant. Elles sont traditionnellement classées en deux catégories : les facteurs relaxants et les facteurs contractants. Les substances qui entraînent une relaxation du muscle lisse sous-jacent sont le monoxyde d'azote, la prostacycline et l'EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor). Les facteurs contractants sont les endothélines, le thromboxane A₂ et les radicaux libres, comme l'anion superoxyde et les endoperoxydes.³

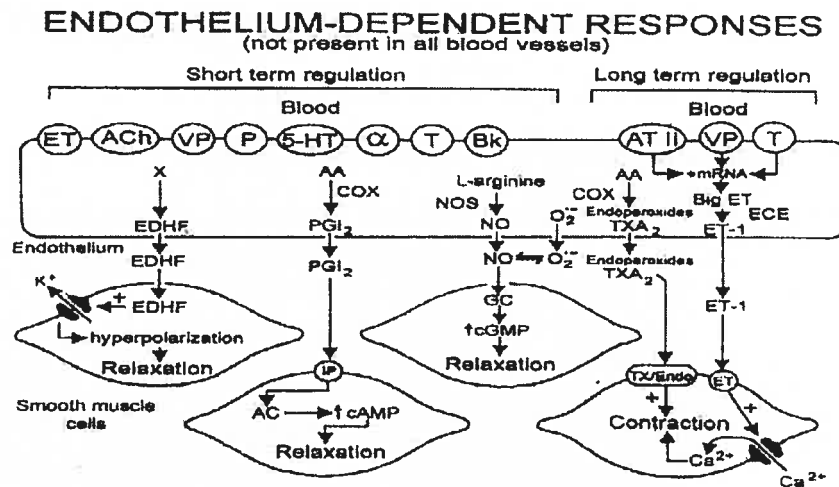


Figure 1: Substances sécrétées par la cellule endothéliale

Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

Monoxyde d'azote (NO)

La substance labile et diffusible, non prostanoïde qui médie la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine décrite par Furchgott et Zawadzki⁴ a été identifiée comme étant le monoxyde d'azote (NO) ou un composé qui en est proche^{5,6,7,8}. Le NO est formé à partir de la portion guanidine azote terminale de la L-arginine par une enzyme appelée NO synthase, qui est constitutive (NO synthase III⁹ ou endothelial NOS (eNOS)) chez les cellules endothéliales normales. Cette enzyme est activée par certains cofacteurs : le calcium, la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la calmoduline, la tétrahydroptérine (BH₄) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). L'enzyme peut être inhibée de façon compétitive par le N-monométhyl-L-Arginine (L-NMMA) et la N-nitro-L-arginine (L-NAME), tous deux analogues de la L-arginine (Figure 2). En plus de cette NO synthase constitutive présente dans les cellules endothéliales, deux autres isoformes de cette enzyme sont connues : une forme neuronale (NOS1 ou nNOS) et une forme inductible (NOS2 ou iNOS).

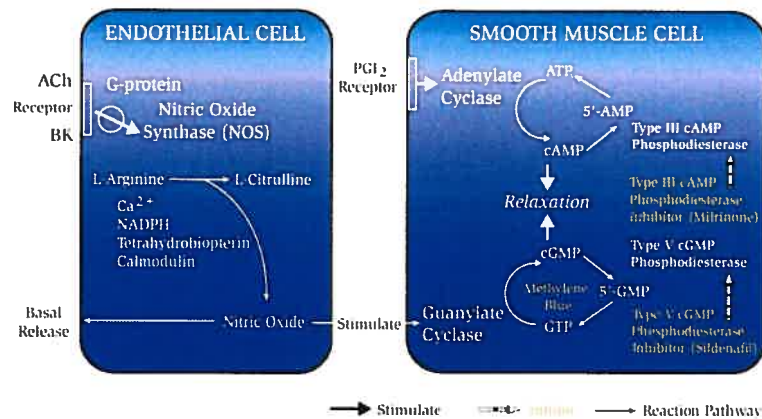


Figure 2: Voie de synthèse du monoxyde d'azote et mécanisme d'action

Les trois isoformes de la NOS ont des similarités structurales importantes et leur mécanisme catalytique est identique. Toutefois, certaines différences entre elles méritent une description. La forme neuronale et endothéliale sont exprimées respectivement dans le système nerveux pour la première et dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes pour la deuxième¹⁰. Ces deux enzymes sont constitutives, elles réagissent aux agonistes augmentant la concentration de calcium intracellulaire, ce qui entraîne le couplage de la NOS à la calmoduline, activant l'enzyme et entraînant la production de faibles quantités de NO (10^{-9} M). La forme inductible (Type II) est indépendante du calcium et est présente dans de nombreux types cellulaires (incluant le muscle lisse vasculaire et les macrophages) après exposition à des endotoxines, au facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor [TNF]) et autres cytokines. L'iNOS produit de grandes quantités de NO, de l'ordre du micromolaire (10^{-6} M).

La cellule endothéliale contient constitutivement la eNOS, mais elle sécrètera du monoxyde d'azote seulement après une cascade d'activation stimulée par des facteurs physiques ou chimiques. Les stimuli physiques sont les forces de cisaillement, l'exercice physique, l'hypoxie chronique et l'insuffisance cardiaque.¹¹ Les forces de cisaillement (shear stress) causées par l'écoulement du sang le long des parois des vaisseaux sont parmi les facteurs principaux qui régissent la production locale de NO. En effet, la vasodilatation dépendante du flot est dépendante de l'endothélium *in vivo*^{12,13}. Des études ont montré qu'une augmentation du débit et la pulsatilité stimulent la production de NO et de prostacycline par l'endothélium des vaisseaux perfusés¹⁴. La vasoconstriction d'artères perfusées induites par l'élévation de la pression endoluminale peut être évitée par l'enlèvement de l'endothélium et est due en partie à une production diminuée de NO^{15, 16}.

De nombreux médiateurs neurohumoraux peuvent entraîner la libération de NO par une activation de récepteurs endothéliaux spécifiques (Figure 3). Ces substances endogènes capables de stimuler cette relâche sont soit des hormones circulantes (cathécholamines, vasopressine), des autacoïdes générés au niveau de la paroi vasculaire (bradykinine, histamine) ou des médiateurs produits par les plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate [ADP], ou formés lors de la coagulation (thrombine)^{5,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27}. Les récepteurs pour ces composés sont en relation avec la production de NO par différentes protéines de couplages. Par exemple, dans les cellules

endothéliales porcines, les récepteurs α_2 -adrénergiques, sérotoninergiques et thrombinergiques sont couplés à des protéines G_i sensibles à la toxine de la coqueluche, alors que pour l'ADP et la bradykinine, ces récepteurs médient la production de NO par l'activation de protéines G_q qui ne sont pas sensibles à la toxine de la coqueluche^{28,29}. Ces protéines G, ainsi que les récepteurs aux agonistes, et les protéines kinases nécessaires à la transduction du signal sont situées à la surface des cellules endothéliales dans des invaginations de la surface appelées cavéoles. Ces cavéoles ont, entre autres, le rôle de contenir un échantillon des agonistes présents à l'extérieur de la cellule endothéliale, afin de stimuler les récepteurs appropriés.

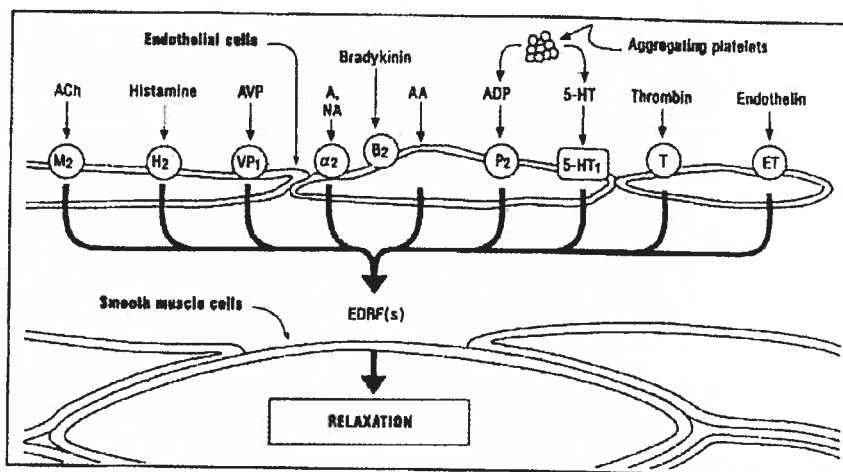


Figure 3: Récepteurs endothéliaux menant à la sécrétion de facteurs vasorelaxants

Le NO diffuse vers les cellules du muscle lisse vasculaire et cause leur relaxation par la stimulation d'une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase

soluble, qui entraîne une augmentation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique). Cette dernière est associée avec l'inhibition de l'appareil contractile (Figure 4). La production de NO contribue de façon importante aux relaxations dépendantes de l'endothélium dans les artères isolées de grand calibre, incluant les artères coronaires, systémiques, mésentériques, pulmonaires et cérébrales. Sa contribution significative *in vivo* est suggérée par l'observation que des inhibiteurs de NO synthase causent une vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires et causent une augmentation de la pression artérielle systémique à la fois chez les animaux et les humains³⁰.

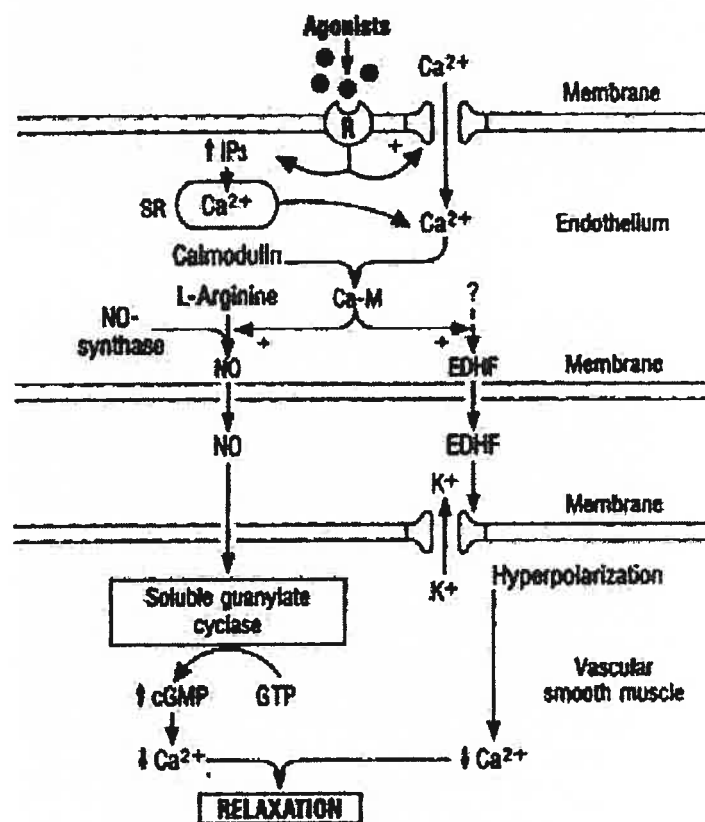


Figure 4: Mécanisme menant à la relaxation du muscle vasculaire lisse

Les cellules endothéliales secrètent le NO non seulement vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent mais aussi dans la lumière du vaisseau sanguin. Dans des circonstances normales, la présence d'oxyhémoglobine dans les érythrocytes neutralise immédiatement le NO, qui a seulement un rôle physiologique à l'interface entre les cellules endothéliales et le sang. De ce fait, le NO inhibe l'adhésion plaquettaire et leucocytaire à l'endothélium. Il agit, en synergie avec la prostacycline afin d'inhiber l'aggrégation plaquettaire^{31,32,33}. Le NO inhibe également la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires.^{34,35}

Tel que mentionné plus tôt, l'action de la NOS inductible (iNOS) survient suite à la stimulation par des cytokines proinflammatoires, le lipopolysaccharide, l'endotoxine et d'autres produits de bactéries.^{36,37} Son activité est indépendante de l'activation par les médiateurs et sa transcription ne change pas avec la concentration intracellulaire de calcium.^{38,39} La présence de l'iNOS semble accrue suite aux dommages vasculaires. On pense que cette expression augmentée pourrait limiter la réponse thrombotique et proliférative suite aux blessures vasculaires⁴⁰. Toutefois, l'augmentation de son expression est aussi observée dans plusieurs maladies systémiques comme le Syndrome de Détresse Respiratoire de l'Adulte (ARDS)³⁷, une entité clinique caractérisée par une atteinte pulmonaire prédominante avec augmentation de la perméabilité vasculaire et oedème alvéolaire. Cette augmentation chronique de iNOS pourrait augmenter les niveaux systémiques

de NO et ainsi favoriser la production systémique de superoxydes et peroxinitrites⁴⁰ et pourrait ainsi entraîner une activité inflammatoire systémique accrue.

Prostacycline (PGI₂)

La prostacycline est produite suite à l'activation de la phospholipase A₂, puis de la cyclooxygénase et de la prostacycline synthétase.⁴¹ Cette réaction se produit généralement dans l'endothélium, dans l'adventice et dans la média des vaisseaux suite à des stimuli comme l'hypoxie et l'étirement. Sa libération est dépendante de la libération d'ions calciques des réserves intracellulaires. Son action se produit dans les lits vasculaires pourvus de récepteurs pour la prostacycline. Ces récepteurs sont couplés à l'adénylate cyclase et entraînent une hausse de l'AMP cyclique intracellulaire qui stimule les canaux potassiques dépendants de l'ATP, entraînant une hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse⁴². En plus de son action vasodilatatrice, la prostacycline cause une inhibition importante de l'aggrégation plaquettaire⁴³.

L'effet relaxant de la prostacycline est additif à celui du NO. En effet, même si le GMPc est formé suite à la stimulation par le NO, il joue un effet inhibiteur endogène de la phosphodiesterase, qui dégrade l'AMPc⁴⁴. Ainsi, le NO augmente la durée de vie du second messenger de la prostacycline. On a aussi remarqué un effet synergique important de ces deux agents au niveau de l'aggrégation plaquettaire⁴⁵.

Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium (EDHF)

Des études électrophysiologiques dans des artères de calibre moyen et de résistance ont montré que la relaxation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine et à la bradykinine, entre autres, était aussi présente suite à une inhibition de la synthèse du NO et de la prostacycline. Cette relaxation est accompagnée d'une hyperpolarisation de la membrane cellulaire du muscle vasculaire lisse. Le facteur responsable n'est toujours pas identifié formellement. Son appellation actuelle est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).⁴⁶ On pense qu'un autre métabolite de l'acide arachidonique, l'acide époxyeicosatriénoïque pourrait avoir des propriétés attribuées à l'EDHF.⁴⁷

L'EDHF semble être produit principalement par le cytochrome P-450 CYP9⁴⁸. Sa production dépend de la présence de calcium intracellulaire et est inhibé par les agonistes de la calmoduline⁴⁹. Il est diffusible et atteint le muscle lisse vasculaire. Il active le canal potassique non dépendant de l'ATP⁵⁰ via une liaison au récepteur muscarinique M1.⁵¹ Même si son action semble plus marquée dans les artères de petite taille, lors de l'inhibition du NO dans les artères de gros calibre, la vasodilatation dépendante de l'endothélium peut atteindre un niveau quasi normal. Des concentrations élevées de NO inhibent la production de l'EDHF.⁵² Ainsi, cette substance pourrait jouer un rôle important lorsque la voie du NO est dysfonctionnelle. Son rôle précis dans les états pathologiques n'est toutefois pas très bien défini⁵³.

Facteurs contractants dérivés de l'endothélium

Dans certaines circonstances, l'endothélium peut initier une vasoconstriction par la libération de substances diffusibles^{54,55,56,57}. Les contractions dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer par le retrait de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) ou par la production de substances diffusibles vasoconstrictrices (EDCF). Les EDCF identifiés jusqu'à présent incluent l'anion superoxide (qui agit présumément en neutralisant le NO⁵⁸), les endoperoxides, la thromboxane A₂ et le peptide endothéline-1. Ce dernier est le plus susceptible de jouer un rôle dans la modulation à long terme du tonus vasculaire et de la structure plutôt que dans la régulation momentanée du degré de vasoconstriction du muscle lisse vasculaire^{59,60,61,62,63}. Les stimuli pour la vasoconstriction dépendante de l'endothélium incluent l'hypoxie, les stimuli physiques tels que la pression et l'étirement ainsi que de nombreux médiateurs neurohumoraux.

Endothélines

L'endothéline fut isolée pour la première fois en 1988 à partir d'aortes de porc. Ce peptide de 21 acides aminés a été remarqué pour la puissante vasoconstriction qu'il induit.⁶⁴ Trois isoformes différentes de l'endothéline existent, seule l'endothéline-1 (ET-1) est synthétisée par l'endothélium. L'endothéline est synthétisée à partir d'un long peptide, la prépro endothéline-1, clivée successivement par des enzymes. Le prépro endothéline devient la

proendothéline, qui deviendra la big endothéline qui sera clivée par l'endothelin-converting enzyme-1 en endothéline-1 mature⁶³ (Figure 5).

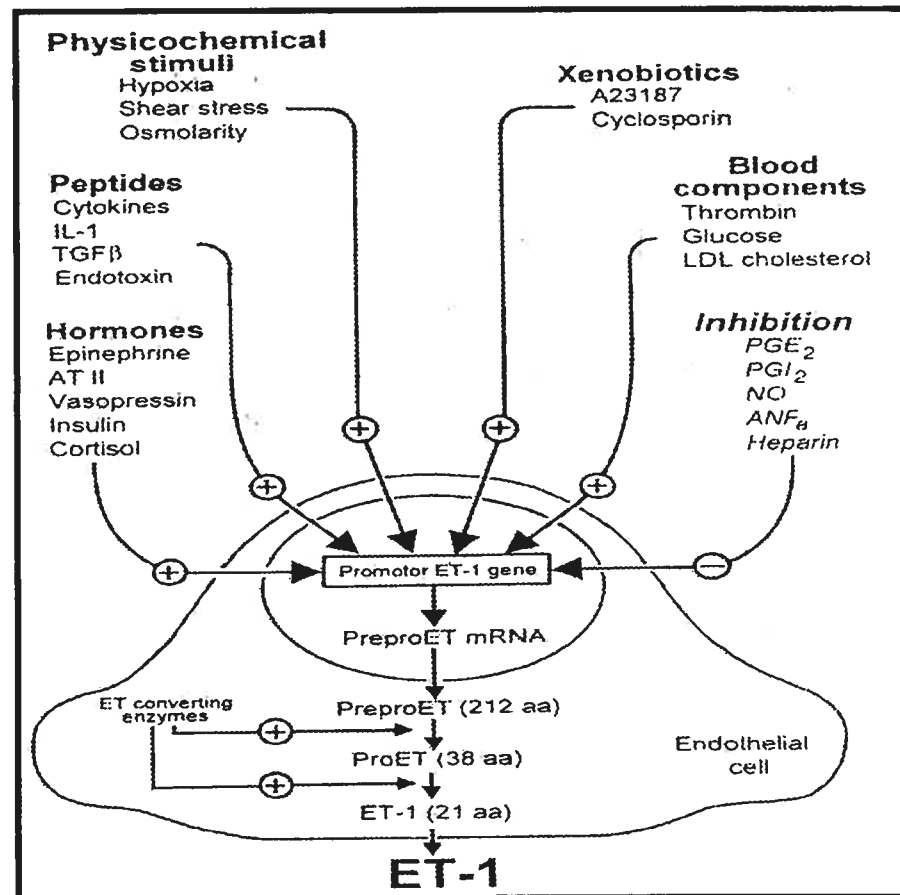


Figure 5: Formation de l'endothéline et facteurs d'influence

La synthèse d'endothéline-1 est stimulée et régulée par plusieurs facteurs. Les forces de cisaillement sont un fort stimulant de la synthèse d'ARNm d'endothéline. L'angiotensine II et plusieurs cytokines entraînent une sécrétion d'endothéline.

Deux types de récepteurs à l'endothéline sont décrits à ce jour : les récepteurs ET_A et ET_B⁶⁵ (Figure 6). Ces deux récepteurs sont couplés à des protéines G. ET_A est couplé à une protéine Gs et Gq alors que ET_B est couplé

à une protéine Gi et Gq. L'activation du récepteur ET_A stimule l'activation de la phospholipase C et de l'adénylate cyclase, ce qui hausse le niveau d'AMPc. L'activation d'ET_B mène à une baisse de la concentration d'AMPc. Le récepteur ET_A est de haute affinité pour l'ET-1 et ET-2, mais de faible affinité pour ET-3. Les récepteurs ET_B sont d'affinité égales pour ET-1, ET-2 et ET-3.

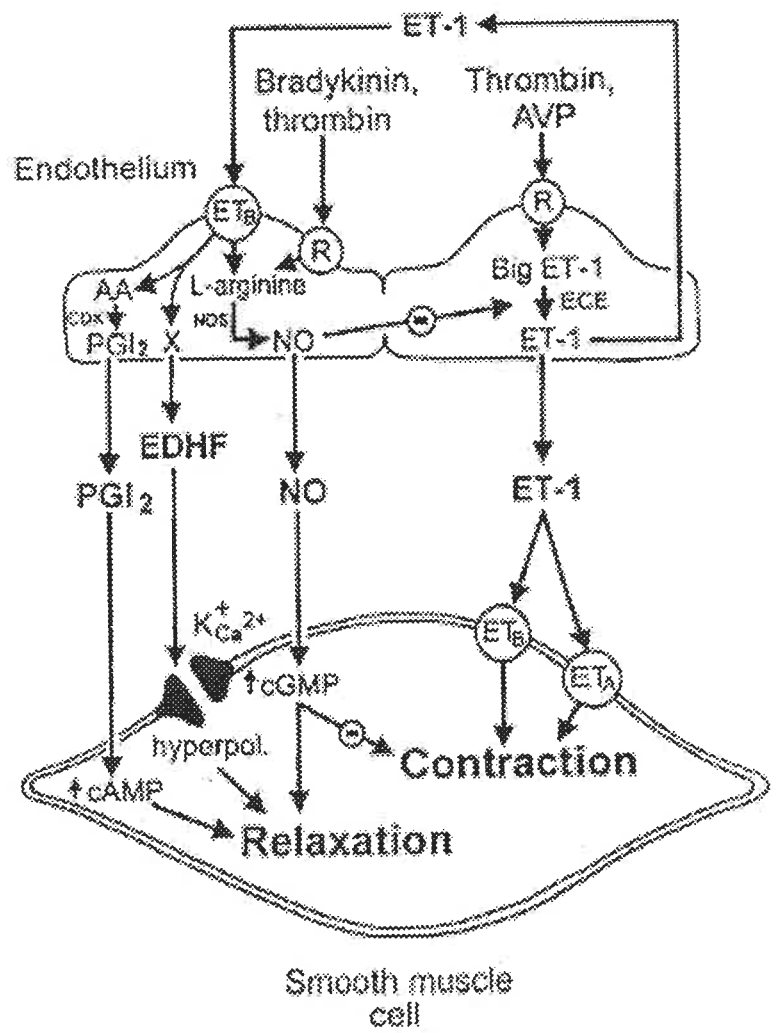


Figure 6: Récepteurs de l'endothéline et effets respectifs

Dans le lit vasculaire, les récepteurs ET_A sont présents sur le muscle lisse vasculaire et leur stimulation entraîne une vasoconstriction. Les récepteurs ET_B sont situés sur l'endothélium et leur stimulation entraîne une sécrétion de

vasodilatateurs comme le NO et la prostacycline. Le rôle de l'endothéline-1 dans le tonus vasculaire est donc complexe, mais l'utilisation simultanée de bloqueurs de l'ET_A et de l'ET_B entraîne une chute des résistances vasculaires systémiques, ce qui suggère un rôle actif dans le maintien du tonus vasculaire basal.⁶⁶

Les donneurs de NO comme le nitroprussiate de sodium inhibent les contractions dépendantes de l'endothéline-1⁶⁷. Ainsi, de basses concentrations d'endothéline induisent la stimulation de l'ET_B, stimulant la production de NO, et la dilatation^{63,68}. Une haute concentration d'endothéline active l'ET_A, causant une constriction.⁶⁹ Si l'endothéline est produite en très grandes quantités, une production importante de NO mènera à une diminution de la production d'ET-1⁶⁷. Ce système de rétroaction négatif est non seulement dépendant du NO, mais aussi de la prostacycline et de l'EDHF.⁷⁰

Le ratio ET_A/ET_B dans les artères pulmonaires est de 9 :1.⁷¹ L'effet de l'ET-1 sur les vaisseaux pulmonaires est une vasoconstriction. Le rôle de l'ET-1 dans l'hypertension pulmonaire semble prépondérant puisque la concentration d'endothéline est augmentée de façon proportionnelle au degré d'HTP. Le poumon est l'un des sites producteurs importants d'ET-1 dans cette pathologie. L'endothéline-1 cause aussi une prolifération de plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, gliales et musculaires lisses. La stimulation des récepteurs ET_A dans les artères pulmonaires cause une

prolifération du muscle vasculaire lisse.⁷² Certains bloqueurs des récepteurs de l'endothéline sont utilisés comme traitement de l'hypertension pulmonaire en clinique.

Thromboxane A₂

Le métabolisme de l'acide arachidonique par la cellule endothéliale peut mener à la sécrétion de prostaglandine H₂, cette prostaglandine est le produit précurseur de tous les prostanoïdes, dont la thromboxane A₂ (TxA₂).⁷³ La production de PGH₂ et de TxA₂ induisent une vasoconstriction suite à l'activation du récepteur aux endoperoxydes et à la thromboxane. Leur action diminue la dilatation engendrée par la stimulation à l'acétylcholine.⁷⁴ Le fait que la prostacycline soit produite en quantité beaucoup plus grande par la cyclooxygénase renverse l'effet de ces vasoconstricteurs. Ils ont donc peu d'impact en physiologie normale. La thromboxane A₂ cause aussi une augmentation de l'aggrégation plaquettaire. Le rôle de la thromboxane semble être prédominant lors d'hémorragies, où la vasoconstriction et l'aggrégation aident à l'hémostase.

Radicaux libres

Les cellules endothéliales sécrètent des radicaux libres comme le peroxide d'hydrogène en réponse aux forces de cisaillement et à d'autres agonistes endothéliaux comme la bradykinine.⁷⁵ Les radicaux libres comme le peroxide

d'hydrogène (H_2O_2) et le radical Hydroxyl ($OH\cdot$) chélatent le monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium, causant ainsi une dysfonction endothéliale.⁷⁶ L'anion superoxide (O_2^-) se lie au NO pour former les peroxynitrites, ceux-ci se décomposent en radicaux hydroxyls, causant une peroxidation des lipides, un des mécanismes par lesquels se produisent des dommages oxydatifs.⁷⁷ Les peroxides de lipides induisent une activation de la phospholipase A_2 , qui entraîne l'expression de molécules d'adhésion, la sécrétion de médiateurs proinflammatoires et de cytokines, qui mèneront ultimement à un roulement, une adhésion et une migration des leucocytes et une sécrétion d'enzymes toxiques pour l'endothélium.⁷⁸ Il est démontré que l'administration d'antioxydants diminue la dysfonction endothéliale de l'artère pulmonaire induite par les radicaux libres.⁷⁹

En résumé, l'endothélium normal répond en se dilatant lorsqu'il y a une augmentation des forces de cisaillement par une sécrétion prédominante de NO, en équilibre avec une sécrétion d'autres facteurs qui moduleront le tonus vasomoteur dépendant du lit vasculaire distal. L'endothélium maintient une surface non thrombogénique grâce à la synthèse de NO et de prostacycline. Lors d'une hémorragie, une sécrétion prédominante de thromboxane A_2 par les plaquettes entraîne une vasoconstriction et une aggrégation plaquettaire. L'endothélium sécrète ensuite les facteurs de croissance nécessaires à la reconstruction des structures endommagées.

Dysfonction endothéliale

L'endothélium devient dysfonctionnel lorsque les fonctions qu'il accomplit normalement sont perturbées. La dysfonction se manifeste par une chute de la synthèse et de la sécrétion de NO, avec une diminution des vasodilatations dépendantes de l'endothélium et une augmentation de l'aggrégation plaquettaire. L'expression accrue de molécules d'adhésion et la sécrétion de facteurs de croissance sont d'autres manifestations caractéristiques de l'endothélium dysfonctionnel. Plusieurs types d'atteintes peuvent altérer le fonctionnement normal de l'endothélium. L'athérosclérose est une des causes importantes de dysfonctionnement endothélial qui résulte de la combinaison de plusieurs facteurs de risque individuels ayant un effet néfaste cumulatif. Les principaux facteurs de risque connus de l'athérosclérose sont l'âge, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète, le tabagisme et la prédisposition génétique à cette maladie. Cette combinaison favorise un état de stress oxydatif élevé favorisant l'adhésion et la migration des monocytes dans l'espace subendothélial, la transformation en macrophages et finalement, la formation de cellules spumeuses (*foam cells*). Ces cellules spumeuses se gorgeront de lipides pour favoriser éventuellement le développement de plaques, lésions typiques de l'athérosclérose.

Plusieurs mécanismes peuvent mener à un endothélium dysfonctionnel. Le dommage initial peut être de nature oxydative, ischémique ou physique.

L'hypertension est un exemple de stimulus physique chronique auquel est soumis l'endothélium. Progressivement, la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium sera altérée en réponse aux différents stimuli auxquels il est confronté. Ces altérations mènent à un débalancement de l'équilibre vasoconstricteur/vasodilatateur, une perte des propriétés antithrombogènes et une sécrétion de facteurs de croissance qui stimuleront la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses.

L'endothélium régénéré présente un exemple de ce type de dysfonction. La durée de vie normale de l'endothélium est d'environ trente ans. Les cellules qui remplacent l'endothélium natif ont perdu certaines de ses caractéristiques, notamment, la sécrétion de substances relaxantes qui est diminuée. En effet, la dilatation secondaire à une stimulation par la sérotonine est diminuée, cette relaxation dépend de la voie sensible à la toxine de la coqueluche (protéine Gi). L'expression des protéines Gi est similaire à celle de l'endothélium natif, mais leur activité est diminuée. Ainsi, la relaxation qui suit l'aggrégation plaquettaire, lors de laquelle de grandes quantités de sérotonine, de thrombine et d'ADP sont sécrétées, est diminuée dans l'endothélium régénéré, avec une sécrétion diminuée de NO.⁸⁰ Dans ces cas, les sites vasculaires recouverts d'endothélium régénéré sont plus à risques d'être le siège de vasoconstriction exagérée et de thrombose subséquente. La dilatation est toutefois maintenue suite à une stimulation de la voie dépendante des protéines Gq (insensible à la toxine de la coqueluche).⁸¹

Nous exposerons maintenant le fonctionnement de la circulation extracorporelle et son effet sur l'endothélium en général, puis son effet spécifique sur les vaisseaux pulmonaires.

Principes de base de la circulation extracorporelle

La circulation extracorporelle fut introduite au début des années 50 et a marqué le début de la chirurgie cardiaque moderne. Plusieurs modifications et améliorations ont permis à cette technologie de devenir plus simple, accessible et moins morbide pour une majorité de chirurgies. Elle permet au chirurgien de travailler sur un coeur arrêté et des poumons dégonflés dans un champs opératoire exsangue. Le sang du patient est recueilli par une canule veineuse au niveau de l'oreillette droite, pompé vers le circuit extracorporel où il sera oxygéné et filtré et renvoyé vers le système artériel par une canule au niveau de l'aorte ascendante⁸². Le sang ainsi dévié évite la circulation pulmonaire et les chambres cardiaques. Le ventilateur peut aussi être cessé étant donné que le sang est oxygéné et déchargé de son CO₂ par l'oxygénateur.

(Figure 7)

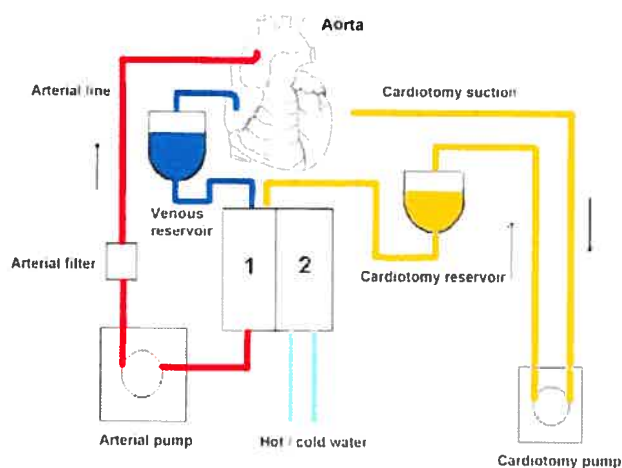


Figure 7: Circuit de circulation extracorporelle

Dysfonction systémique et circulation extracorporelle (CEC)

La circulation extracorporelle, utilisée quotidiennement en chirurgie cardiaque, entraîne plusieurs modifications physiologiques qui persistent pendant une période variable. Parmi ces modifications, on note une activation de la cascade inflammatoire^{83,84,85,86,87,88,89,90,91} et une altération de la fonction normale de l'endothélium⁹². Les altérations de la fonction endothéliale des circulations coronarienne et pulmonaire seront décrites en détails ultérieurement.

Plusieurs auteurs ont décrit l'activation des systèmes de coagulation, d'inflammation et de fibrinolyse suite à l'utilisation de la circulation extracorporelle. Cette activation inflammatoire systémique (SIRS lié à la CEC) se manifeste par une activation du complément, une relâche de nombreuses cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α), une activation leucocytaire, une production de radicaux libres, de métabolites de l'acide arachidonique, de Facteur Activateur des Plaquettes (PAF), de NO et d'endothéline. Cette cascade entraîne une multitude de conséquences cliniques incluant des désordres neurologiques, hépatiques, rénaux, respiratoires et de la coagulation.

Complément

Le système du complément est composé d'une série de protéines circulantes faisant partie du système immunitaire et est composé d'une voie

classique et d'une voie alterne. L'activation de l'une ou l'autre des voies mène à la production du complexe d'attaque membranaire, qui sert à la défense de l'organisme. Le contact du sang avec le circuit extracorporel active la voie alterne et cause la libération de plusieurs sous produits comme les anaphylatoxines C3a et C5a. Ces anaphylatoxines causent une relâche d'histamine, une hausse de perméabilité capillaire et une libération de radicaux libres par les leucocytes. Le C3a cause également une activation plaquettaire.

Leucocytes

Les leucocytes sont impliqués dans une multitude de réactions inflammatoires et leur activation peut être directe ou en réponse à des substances circulantes. Pendant la circulation extracorporelle, les leucocytes sont activés suite au contact avec le circuit extracorporel et par la présence de C3a, C5a, du PAF et de leukotriène B₄. Après leur activation, les leucocytes expriment des molécules d'adhésion, s'accrochent à l'endothélium sous-jacent et libèrent ensuite des enzymes et radicaux libres qui endommageront les cellules environnantes, causant des lésions endothéliales.

Radicaux libres

L'anion superoxide, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl sont des radicaux libres. Ils sont formés en majeure partie par les leucocytes

activés et agissent en lésant les membranes cellulaires. Les lésions membranaires augmentent la perméabilité capillaire et entraînent une exudation de liquide, de protéines et de cellules hors du compartiment vasculaire. Il est bien démontré que la circulation extracorporelle entraîne une hausse sérique des produits de dégradation de radicaux libres et de membranes cellulaires. L'un de ces produits est le malondialdéhyde (MDA), un produit de dégradation des lipides qui augmente de façon marquée dans le sang après la CEC.⁹³

Neutrophiles

Les neutrophiles sécrètent, en plus de radicaux libres, de la thromboxane A_2 et des prostaglandines. Ces deux substances sont dérivées de l'acide arachidonique. La thromboxane A_2 cause l'aggrégation des plaquettes et une vasoconstriction. Elle entraîne une dysfonction pulmonaire⁹⁴ et myocardique⁹⁵ après la CEC et sa demie vie sérique est courte. Les prostaglandines comme la prostacycline (PGI_2) et la prostaglandine E_1 ont des effets antagonistes à la thromboxane mais ne sont pas sécrétées de façon préférentielle lors de la CEC. Leur action antiaggrégante et vasodilatatrice permet leur utilisation dans certaines situation cliniques, comme par exemple l'epoprosténol, un analogue de la prostacycline, qui est utilisé par voie inhalée et intraveineuse dans le traitement de l'hypertension pulmonaire.

Endotoxine

L'endotoxine est un produit des bactéries gram négatives que l'on retrouve en circulation chez les patients soumis à la CEC.⁹⁶ L'intestin est un site de prédilection pour le passage sérique d'endotoxine. On pense en effet que l'ischémie splanchnique joue un rôle dans la translocation bactérienne au niveau de la muqueuse suite à la vasoconstriction causée par la CEC.⁹⁷ Cette endotoxémie pourrait être un des principaux activateurs du complément et de formation de $\text{TNF}\alpha$, une cytokine proinflammatoire.

Cytokines

Plusieurs cytokines sont sécrétées pendant la CEC, dont le $\text{TNF}\alpha$, à IL-6 et IL-8. Les phénomènes d'ischémie-reperfusion, l'activation du complément et la relâche d'endotoxines sont tous des facteurs contributifs à leur sécrétion. Leur rôle est principalement une action proinflammatoire qui entraîne une dysfonction cardiaque et activent les leucocytes.

Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un facteur relaxant dérivé de l'endothélium qui inhibe la coagulation et l'adhésion plaquettaire. Le NO a une courte durée d'action et est produit de façon continue par l'endothélium intact. Lors de la

CEC, la forme inductible de NO synthase (iNOS) produit de grandes quantités de NO qui causent une vasoplégie, c'est-à-dire une vasodilatation difficilement réversible. La diminution d'expression de NO synthase de type endothélial (eNOS) est liée au développement d'hypertension pulmonaire lors de la CEC par la chute de production constitutive de NO en réponse aux forces de cisaillement.

Endothéline

L'endothéline est un vasoconstricteur endogène puissant sécrété de façon prédominante vers la fin de la CEC de façon proportionnelle à la durée de la CEC.⁹⁸ La sécrétion d'endothéline peut entraîner une ischémie myocardique,⁹⁹ par la hausse de pression artérielle qu'elle engendre qui augmente la postcharge myocardique haussant le travail ventriculaire gauche. Dans un contexte d'apport sanguin limité, cette surcharge de travail peut mener à de l'ischémie et éventuellement de la nécrose myocardique.

Ainsi, la circulation extracorporelle engendre une réaction majeure qui touche plusieurs systèmes simultanément. Lors de cette dysfonction multisystémique, l'endothélium est une des cibles de choix. L'endothélium coronaire et pulmonaire subit plusieurs altérations pendant et après la CEC. L'ischémie touche surtout l'endothélium pulmonaire pendant la CEC alors que les coronaires reçoivent un sang oxygéné, mais chargé de cytokines

proinflammatoires et de complément activé. Après la CEC, l'endothélium pulmonaire subit un stress oxydatif important dû à la production de radicaux libres comme l'anion superoxide, le peroxide d'hydrogène et le radical hydroxyl suite à la reperfusion avec du sang oxygéné.

Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est définie par une pression systolique de l'artère pulmonaire supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'exercice et est classifiée en hypertension pulmonaire primaire et secondaire.

L'hypertension pulmonaire primaire, ou idiopathique se définit par une absence de maladie pulmonaire parenchymateuse, de maladie chronique thromboembolique, de maladie valvulaire ou myocardique à gauche, de maladie cardiaque congénitale ou de maladie systémique du tissu conjonctif (collagénoses).

L'hypertension pulmonaire primaire peut être d'origine familiale, dans 10% des cas, ou survenir suite à l'exposition à certains facteurs de risque. Les facteurs principaux sont l'utilisation de médicaments anorexigènes, de cocaïne, d'amphétamines, l'hypertension portale et l'infection par le VIH.¹⁰⁰

La dysfonction de l'endothélium pulmonaire est responsable au moins en partie de l'hypertension pulmonaire primaire. En effet, la production de monoxyde d'azote et de prostacycline au sein de la circulation pulmonaire de patients atteints est diminuée, de plus, on note une augmentation de la sécrétion d'endothéline.^{101,102,103,104,105,106} Ces perturbations physiologiques mènent à un remodelage progressif et à une fibrose du lit vasculaire

pulmonaire, mais il est difficile d'établir laquelle des entités : dysfonction endothéliale ou hypertension pulmonaire, survient en premier. Une autre piste de recherche actuelle est la dysfonction des canaux potassiques voltage-dépendants^{107,108} dans la cellule musculaire lisse. Cette dysfonction entraînerait une hausse du calcium intracellulaire et des changements du potentiel de membrane associés à une hausse du tonus vasculaire.

L'hypertension pulmonaire secondaire survient suite à une maladie pulmonaire parenchymateuse, une maladie chronique thromboembolique, une maladie valvulaire ou myocardique à gauche, une maladie cardiaque congénitale ou une maladie systémique du tissu conjonctif. La pression pulmonaire moyenne (PAPm) est égale au produit du débit cardiaque (Q) et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) additionné de la pression veineuse pulmonaire (estimée par la pression capillaire pulmonaire bloquée(w)).

$$\text{Pap moyenne} = (Q \times \text{RVPR}) + w$$

Ainsi, le changement de flot pulmonaire par une anomalie cardiaque comme un shunt, les hausses de la résistance pulmonaire par vasoconstriction hypoxique lors de maladies pulmonaires obstructives chroniques et la hausse de la pression veineuse pulmonaire, comme dans la sténose mitrale peuvent engendrer de l'hypertension pulmonaire secondaire. Le ventricule droit peut

normalement développer des pressions systoliques de 40 à 50 mmHg, mais avec l'augmentation chronique de résistance, il peut soutenir des systoliques qui atteignent 100 mmHg. Lorsque la capacité d'adaptation du ventricule droit est dépassée, le ventricule se dilate et le patient devient très symptomatique ce qui coïncide avec une atteinte irréversible des vaisseaux pulmonaires.

Dysfonction endothéliale coronarienne et pulmonaire suivant une CEC

Des expériences récentes dans notre laboratoire ont documenté et caractérisé la survenue d'une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronaires^{109,110} et des artères pulmonaires^{111,112} suite à l'utilisation de la circulation extracorporelle.

Au niveau des coronaires, la contraction d'anneaux artériels suite à l'exposition à du KCl est de moindre amplitude suite à une CEC. Les doses de prostaglandine-F2 α (vasoconstricteur indépendant de l'endothélium) pour obtenir une contraction sont plus élevées pour un anneau exposé à une CEC que pour un anneau contrôle, probablement suite à une expression augmentée d'iNOS qui, en produisant de hautes quantités de NO, diminue la sensibilité aux agents vasoconstricteurs. On remarque aussi que les relaxations dépendantes de l'endothélium suite à une stimulation par l'acétylcholine

(ACh), dont les récepteurs sont couplés aux protéines G_i (sensible à la toxine de la coqueluche) sont altérées de façon marquée. Cette diminution de sensibilité s'explique possiblement par un découplage fonctionnel entre le récepteur et la voie effectrice (protéine G_i). De plus, les relaxations dépendantes de l'endothélium qui suivent la stimulation par bradykinine (BK) médiées par la protéine G_q (insensible à la toxine de la coqueluche) sont diminuées de façon moins importante suite à la CEC. Le découplage entre le récepteur et les protéines G serait donc sélectif à une seule des voies de production du NO.

Chez le porc, le blocage de la synthèse du NO par le L-NMMA, un inhibiteur spécifique, lors de stimulation à la bradykinine n'inhibe pas totalement la relaxation dépendante de l'endothélium. De plus, l'AMPc est exprimée de façon plus marquée chez les porcs ayant subi une CEC. Ces deux constatations appuient la théorie qu'une atteinte de la voie du NO est partiellement limitée par la compensation par d'autres facteurs, notamment la prostacycline et l'EDHF. Finalement, la concentration de GMPc est diminuée dans la paroi des artères coronaires en comparaison aux porcs qui n'ont pas subi de chirurgie avec CEC, ce qui concorde aussi avec une diminution de la production de NO par l'endothélium suite à la CEC. Les étiologies suspectées de cette chute en GMPc, effecteur terminal de la voie du NO, sont une hausse de radicaux libres suivant la CEC et/ou une diminution de la production de NO. L'exposition à une CEC de 90 minutes suivie de 60 minutes de

reperfusion entraîne donc une altération fonctionnelle des artères coronaires, mais l'intégrité morphologique de l'endothélium est conservée telle que démontrée par coloration au nitrate d'argent.

Dysfonction endothéliale pulmonaire suivant la CEC

Au niveau des artères pulmonaires, l'amplitude de la contraction indépendante de l'endothélium d'anneaux après exposition au KCl et à la phényléphrine est diminuée, probablement suite à une hausse des concentrations d'iNOS, entraînant une vasoplégie. La concentration de phényléphrine nécessaire pour obtenir une contraction similaire est aussi plus élevée. Une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium suite à la stimulation à l'acétylcholine, dont les récepteurs sont couplés aux protéines G_i est mise en évidence après 90 minutes sous CEC et 60 minutes de reperfusion. Une dysfonction de même intensité est également observée après une CEC de 150 minutes. Il est à noter que la relaxation dépendante des protéines G_q (par stimulation avec la bradykinine) n'est pas altérée par la CEC. Ainsi, l'atteinte fonctionnelle serait spécifique à la voie G_i . De plus, la circulation extracorporelle seule, sans reperfusion n'est pas associée à une dysfonction endothéliale. Cette constatation s'explique probablement par l'absence de dommages oxydatifs causés par l'arrivée massive de radicaux libres lors de la reperfusion sur un endothélium déjà sensibilisé par l'ischémie (lésion d'ischémie-reperfusion). La CEC est aussi associée à une baisse de

l'expression de eNOS dans les vaisseaux pulmonaires¹¹³ ce qui se traduit par une diminution de production du NO, avec une vasoconstriction et une hypertension pulmonaire subséquente.¹¹⁴ Nyhan et al. ont démontré que l'utilisation de CEC chez le chien pendant 150 minutes suivi de 60 minutes de reperfusion entraîne une dysfonction endothéliale qui persiste 4 jours après l'intervention. La relaxation dépendante de l'endothélium suite à stimulation par l'acétylcholine (dont les récepteurs sont couplés aux protéines Gi) sont altérées au quatrième jours, mais reviennent à leur valeur basale 14 jours après exposition à la CEC.¹¹⁵ L'atteinte endothéliale suivant la CEC s'inscrit dans un contexte plus large d'une dysfonction du système respiratoire décrite tant chez l'animal qu'en clinique suivant la chirurgie cardiaque.

Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire suivant la CEC

Plusieurs auteurs ont tenté d'analyser et de comprendre la réaction pulmonaire à la circulation extracorporelle qui s'inscrit dans un continuum variant de changements physiologiques minimales à l'ARDS floride dans les pires cas. Cette dernière complication est rare et survient dans environ 1.3% des cas de chirurgie cardiaque, mais qui peut être mortelle dans plus de 50% des cas¹¹⁶. L'atteinte pulmonaire suivant la CEC est désignée par le *poumon de pompe* (pump lung) et le *syndrome post pompe* (post pump syndrome). L'atteinte pulmonaire s'accompagne d'une réaction inflammatoire systémique. Le rôle du poumon dans cette réaction globale reste inconnu, mais sa

contribution par la synthèse de médiateurs comme l'endothéline et les radicaux libres ainsi que par l'activation d'éléments figurés du sang est certaine. Les principales manifestations physiopathologiques observées au niveau des poumons suivant la CEC sont une activation du complément, une séquestration des leucocytes, une synthèse de radicaux libres, une baisse de l'expression de la NO synthase endothéliale et de la concentration de NO localement et une synthèse d'interleukines. Ces différents phénomènes ont des répercussions cliniques telle que la baisse du ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ^{117,118}, l'oedème pulmonaire, la baisse de la compliance pulmonaire et la hausse de la résistance vasculaire pulmonaire¹¹⁹.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été proposés pour expliquer l'ampleur de cette réaction pulmonaire dont le cycle d'ischémie-reperfusion qui semble une des causes importantes de lésion pulmonaire. En effet, lors de la CEC, le poumon est le seul organe à ne pas être irrigué par la pompe, le sang étant dévié à partir de l'oreillette droite vers l'aorte, donc, pendant la CEC, seule la circulation bronchique contribue à l'apport sanguin au parenchyme pulmonaire. Chai a d'ailleurs démontré qu'une circulation extracorporelle totale accompagnée d'un clampage de l'artère pulmonaire dans un modèle porcin était associé à une dysfonction endothéliale de l'artère pulmonaire plus importante que dans une CEC traditionnelle¹²⁰. La ventilation mécanique est discontinuée pendant la durée de la CEC dans la majorité des unités de chirurgie cardiaque et le tube endotrachéal est débranché du

ventilateur, ce qui laisse la pression intrapulmonaire s'équilibrer avec la pression atmosphérique et cause une atélectasie pulmonaire diffuse.

L'autre mécanisme proposé pour expliquer la cascade inflammatoire suivant la CEC est le contact des éléments sanguins avec le circuit de la pompe, qui cause l'activation des leucocytes, des plaquettes, du complément et de la cascade de la coagulation.

Le lit vasculaire pulmonaire est un système à haute capacitance et à basse pression¹²¹, ce qui fait que seule une hausse de la résistance peut causer une augmentation de la pression pulmonaire. En effet, même si la pression pulmonaire systolique normale se situe en deçà de 25 mmHg, ce qui correspond à une résistance vasculaire pulmonaire de 67 ± 30 dynes \times s \times cm⁻², une élévation modeste de la résistance de ces vaisseaux qui sont en parallèle suffit à augmenter le travail du ventricule droit de façon importante. Le ventricule droit s'accommode relativement bien d'une surcharge volémique mais est très sensible à la surcharge en pression. Ainsi, suite à une CEC prolongée ou chez le patient souffrant d'hypertension pulmonaire préopératoire, la hausse de la pression pulmonaire peut entraîner une dysfonction importante du ventricule droit¹⁰⁴. Les médiateurs d'hypertension pulmonaire activés par la CEC sont multiples et leurs modes d'action seront décrits dans les pages qui suivent.

Complément

Le complément est l'un des médiateurs de la dysfonction pulmonaire suivant la CEC. Comme dans le syndrome inflammatoire systémique décrit précédemment, le C3a et le C5a sont deux anaphylatoxines activées précocément lors de la CEC ayant des répercussions sur les vaisseaux pulmonaires.¹²² Le C5a est chimotactique pour les neutrophiles et il stimule leur adhésion à l'endothélium pulmonaire via l'expression de P-sélectines¹²³. Les neutrophiles liés aux sélectines sont ensuite séquestrés dans l'endothélium et l'endommagent en sécrétant des substances toxiques. Le rôle du complément semble important puisque le traitement de porcs avec des inhibiteurs du C3 et du C5 durant la CEC entraîne une chute des résistances vasculaires pulmonaires.¹²⁴

Neutrophiles

Les neutrophiles sont activés par le complément. Lors du contact avec un endothélium sain, non-activé, ils rebondissent et restent en circulation. L'expression de molécules d'adhésion comme les sélectines causent un roulement et éventuellement un arrêt des neutrophiles qui migrent ensuite au travers de l'endothélium. Les neutrophiles adhérents sont activés et sécrètent des radicaux libres, des protéases et de la myéloperoxydase.¹²⁵ La concentration en neutrophile élastase, une protéase, suivant une CEC est

correlée positivement avec une dysfonction respiratoire^{126,127}. De plus, le décompte de neutrophiles dans le sang de l'artère pulmonaire est plus grand que dans la circulation systémique, suggérant une séquestration des neutrophiles dans les poumons lors de la CEC¹⁰⁷. Cette trouvaille concorde avec l'augmentation du décompte des neutrophiles au lavage broncho-alvéolaire post CEC¹²⁸. Dans un modèle canin, l'utilisation de filtre leucocytaire lors de la CEC diminue l'atteinte pulmonaire post opératoire en améliorant la pression partielle d'oxygène dans le sang, ce suggère un maintien de l'intégrité de l'arbre vasculaire pulmonaire.¹²⁹ Dans un autre modèle canin, utilisé par Dreyer¹³⁰, une activation et une séquestration pulmonaire de neutrophiles suivant la CEC a également été démontrée. Ces neutrophiles activés sécrètent plus de radicaux libres comparativement aux neutrophiles circulants non-activés. Le traitement des chiens avec un inhibiteur du récepteur CD18, un récepteur de surface leucocytaire, avant l'instauration de la CEC limite la rétention liquidienne pulmonaire et améliore l'oxygénation, évoquant donc un rôle prépondérant de l'activation leucocytaire de ces récepteurs dans ce phénomène. Des études utilisant des neutrophiles marqués avec des isotopes radioactifs ont aussi mis en évidence une séquestration neutrophilique au niveau pulmonaire et rénal suivant la CEC.¹³¹

Cytokines

En plus de la séquestration des neutrophiles activés, le réseau vasculaire pulmonaire présente plusieurs autres atteintes dues à une multitude de

cytokines impliquées dans la dysfonction pulmonaire suivant la CEC. Parmi celles-ci, le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-8 et l'IL-6 présentent des niveaux sériques augmentés suivant la CEC¹³² qui sont plus élevés au niveau de l'oreillette gauche que dans la circulation pulmonaire¹³³, ce qui implique une production intrapulmonaire de ces médiateurs. De façon similaire, l'activation de la voie de l'acide arachidonique, en particulier celle de la thromboxane A_2 , semble contribuer grandement à l'hypertension pulmonaire suivant la CEC. Friedman a d'ailleurs démontré que la concentration de thromboxane était augmentée dans les veines pulmonaires suite à la chirurgie¹³⁴ et que l'inhibition de la synthèse de la thromboxane menait à une diminution des résistances vasculaires pulmonaires, de la séquestration plaquettaire et leucocytaire et du contenu pulmonaire en eau suivant la CEC¹³⁵. Les plaquettes, les macrophages et les monocytes sont aussi impliqués dans la sécrétion de substances vasoactives et chimiotactiques, mais leur rôle exact est toutefois moins bien défini.

Pistes de solution à la dysfonction pulmonaire post CEC

Devant l'amplitude des répercussions pulmonaires de la CEC, plusieurs chercheurs ont tenté de trouver des solutions pour les atténuer. Les trois grandes avenues utilisées sont des techniques de ventilation pulmonaire pendant la CEC, visant à diminuer l'atélectasie; des techniques de perfusion de la circulation pulmonaire tentant de diminuer les phénomènes d'ischémie-reperfusion; et l'utilisation de traitements pharmacologiques aux cibles multiples.

Ventilation

Tel que décrit plus tôt, la ventilation mécanique est traditionnellement interrompue pendant la CEC, mais certains auteurs ont tenté différentes stratégies de ventilation pendant la perfusion extracorporelle.

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que la ventilation pendant le temps sous CEC diminuait la dysfonction endothéliale pulmonaire en post-opératoire chez le porc¹³⁶. De plus, une autre équipe a démontré que l'utilisation d'une manoeuvre de recrutement, c'est-à-dire l'inflation pulmonaire à capacité vitale chez le porc, à la sortie de CEC, diminuait le shunt intrapulmonaire¹³⁷. Chez l'humain, Lockinger a étudié l'effet d'une

pression positive continue (CPAP) dans le circuit respiratoire pendant la CEC. De façon intéressante, il a démontré que l'oxygénation en post-opératoire était meilleure chez les patients sous CPAP, avec un meilleur ratio V/Q et une plus faible différence alvéolo-artérielle en oxygène ($AaDO_2$).¹³⁸ Loer et al. a démontré, à l'aide d'un modèle de ventilation pulmonaire unilatérale¹³⁹, des niveaux d'endothéline et de lactates inchangés dans le sang veineux pulmonaire bilatéral après une heure de CEC. Ainsi, l'impact clinique d'une ventilation pendant toute la chirurgie est inconnu, mais il est peu probable qu'une ischémie importante se produise au niveau pulmonaire en une heure de CEC dans les poumons non ventilés. Une étude randomisée chez les patients opérés pour pontages aorto-coronariens pour évaluer l'effet de la ventilation sur les paramètres hémodynamiques et respiratoires pendant et après la chirurgie a été débutée dans notre milieu.

Perfusion

Certains auteurs ont plutôt consacré leurs efforts à la perfusion de l'artère pulmonaire pour diminuer la dysfonction endothéliale après la CEC. Serraf *et al.* ont utilisé la perfusion pulmonaire à bas débit pendant la CEC et ont démontré une baisse des résistances vasculaires pulmonaires, une hausse du débit cardiaque et une hausse de PaO_2 , sans toutefois objectiver de diminution significative de la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires observée suite à la CEC, caractérisée par une diminution des relaxations dépendantes de

l'endothélium après stimulation par l'acétylcholine (récepteurs couplés aux protéines Gi).¹⁴⁰ Liu et al ont aussi utilisé une perfusion cristalloïde afin de protéger la circulation pulmonaire lors de la CEC, il ont démontré une chute des résistances vasculaires pulmonaires et des pressions de ventilation pulmonaires en sortie de CEC¹⁴¹.

Une autre technique de perfusion pulmonaire est la technique de Drew-Anderson lors de laquelle les poumons du patient sont utilisés comme oxygénateur, ainsi, le sang est aspiré de l'oreillette droite, injecté dans l'artère pulmonaire, réaspiré de l'oreillette gauche et finalement acheminé dans l'aorte. Cette technique a été étudiée chez 15 patient qui ont été comparés à 15 contrôles. La sécrétion d'interleukines 6 et 8 fut diminuée de façon significative chez les patients utilisant la technique à l'essai, aussi, les délais avant l'extubation étaient diminués et l'oxygénation améliorée.¹⁴²

Traitement pharmacologique

Le troisième type de techniques utilisées pour réduire les complications pulmonaires et améliorer le devenir clinique du patient est l'utilisation de traitements pharmacologiques avant, pendant et après la circulation extracorporelle. Certaines molécules ont été utilisées par voie inhalée, par voie intraveineuse et par voie orale.

Analogues de la prostacycline/NO

Tout d'abord, l'utilisation de médicaments par voie inhalée semble prometteuse, car elle permet une distribution locale du médicament. Dans le même modèle porcin décrit dans notre laboratoire, l'administration d'époprosténol, un analogue de la PGI₂ (bolus 2-2.5µg /kg, plus nébulisation à 0.1µg/kg) pendant la CEC avec un CPAP de 3 cm H₂O a causé une hausse de la quantité d'AMPc dans les artères pulmonaires suggérant une compensation pour la dysfonction de la voie du NO. De plus, une amélioration de l'oxygénation en post CEC exprimée par un meilleur ratio PaO₂/ FiO₂ chez le groupe traité par prostaglandines inhalées a été objectivée.¹⁴³ D'autres études utilisant des doses de 60µg d'époprosténol administrées avant l'incision chirurgicale chez des patients atteints d'hypertension pulmonaire ont démontré une baisse des pressions pulmonaires, une baisse du travail ventriculaire droit sans effets secondaires¹⁴⁴. L'utilisation de NO inhalé a aussi été décrite chez le porc et chez l'humain¹⁴⁵. Ces études démontrent une diminution de la dysfonction endothéliale suivant la CEC chez le porc et une amélioration de la pression de l'artère pulmonaire, du travail ventriculaire droit et de l'oxygénation lorsqu'administré pendant la chirurgie cardiaque. Plusieurs autres molécules sont présentement à l'étude pour diminuer la pression pulmonaire chez les patients qui présentent une hypertension pulmonaire avant ou après la chirurgie cardiaque¹⁴⁶. Parmi ces molécules, les donneurs

de NO (nitroprussiate de sodium, nitroglycérine) et les inhibiteurs de la phosphodiesterase (milrinone)¹⁴⁷ donnent de résultats prometteurs et feront peut-être partie de l'arsenal thérapeutique du futur. Certains de ces médicaments peuvent être administrés par voie intraveineuse. En effet, chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire suivant la CEC, la nitroglycérine intraveineuse ou la milrinone sont couramment utilisées alors que l'utilisation d'autres molécules a été décrite plus récemment. Kawashima a décrit l'utilisation d'iloprost (prostacycline) intraveineuse, une prostaglandine, dans les lésions d'ischémie-reperfusion dans un modèle de poumon de rat perfusé. L'iloprost diminue l'œdème pulmonaire suivant le cycle d'ischémie-reperfusion par un mécanisme impliquant probablement l'inhibition d'endothéline puisque les métabolites de l'endothéline sont diminués dans le sang veineux pulmonaire.¹⁴⁸

Sildenafil

Un autre médicament utilisé depuis peu dans l'hypertension pulmonaire est le Sildenafil (Viagra. Pfizer, McKesson, Montreal, QC, Canada). En effet, ce médicament qui peut être administré de façon intraveineuse, *per os*, ou en nébulisation, a été testé dans plusieurs situations chez l'animal et à quelques reprises chez l'humain. Le sildenafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase V utilisé dans le traitement de la dysfonction érectile en administration *per os*. La phosphodiesterase V dégrade le GMPc produit par la guanylate cyclase

activée par la présence de NO dérivé de l'endothélium dans le muscle lisse. Le GMP cyclique entraîne une relaxation du muscle vasculaire lisse. En inhibant l'enzyme responsable de la dégradation du GMPc, le sildenafil maintient l'effet vasodilatateur du NO dans les tissus.

Certains auteurs ont documenté l'effet du sildenafil dans l'hypertension pulmonaire. Shekerdemian utilisant un modèle d'aspiration méconiale chez le porcelet causant une hypertension pulmonaire, a démontré que le sildenafil intraveineux entraînait une chute de 40% des résistances pulmonaires, une hausse de 30% du débit cardiaque, sans effets néfastes sur l'oxygénation.¹⁴⁹ De plus, dans un modèle d'hypertension pulmonaire chez le mouton provoqué par une perfusion d'un analogue de la thromboxane A₂, l'administration de sildenafil inhalé concomitamment avec du NO inhalé potentialise l'effet de ce dernier sans altération de l'oxygénation ou du shunt droit-gauche.¹⁵⁰ Michelakis a aussi démontré que l'administration préopératoire de sildenafil *per os* à des patients avec hypertension pulmonaire était supérieure au NO inhalé pour augmenter le débit cardiaque sans augmenter la pression capillaire pulmonaire bloquée (wedge) avec une baisse similaire de la pression de l'artère pulmonaire.¹⁵¹ L'équipe de Zhao utilisant un modèle de vasoconstriction pulmonaire hypoxique chez des humains respirant de l'oxygène à 11% a démontré une hausse de près de 50% des pressions de l'artère pulmonaire chez le groupe contrôle, alors que le groupe ayant reçu du sildenafil (100 mg *per os*) n'a pas présenté d'HTAP.¹⁵²

Différentes doses de sildenafil ont été proposées. Ayant une biodisponibilité orale de 40%, le sildenafil s'administre chez l'humain à des doses de 50 à 100 mg, soit environ 0.7 à 1.5 mg / kg. Michelakis utilisait une dose de 75 mg chez l'humain tandis que l'équipe de Kleinsasser utilisait trois doses, soit 25, 50 et 100 mg *per os*.¹⁵³ Ces derniers ont documenté une détérioration de la PaO₂ chez les 3 groupes, avec une chute des pressions artérielles systémique et pulmonaire aux doses les plus élevées et une hausse du débit cardiaque chez tous les groupes. Il recommandait donc l'utilisation de la dose la plus faible en raison des bénéfices supérieurs. D'autres auteurs utilisent une dose équivalente à 2mg/kg *per os* avant la chirurgie^{154,155}. L'équipe de Przyklenk a pour sa part utilisé du sildenafil intraveineux à dose de 0.7 à 1.4 mg/kg chez le chien.¹⁵⁶ La dose utilisée varie donc entre 1 et 2 mg/ kg.

Milrinone

La milrinone est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type III. Elle augmente la concentration intracellulaire d'AMP cyclique en diminuant sa dégradation. Lorsqu'administrée de façon systémique, son action principale est un inotropisme cardiaque et une vasorelaxation suite à une hausse de la concentration en calcium intracytoplasmique. Cette molécule peut être administrée par voie intraveineuse, et plus récemment par voie inhalée.

L'utilisation de milrinone par voie intraveineuse est répandue dans les unités de chirurgie cardiaque. Les indications les plus fréquentes d'utilisation

sont le bas débit cardiaque et l'hypertension pulmonaire. La milrinone entraîne plusieurs altérations hémodynamiques lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse, notamment une chute des résistances vasculaires systémiques. Bien que la hausse du débit cardiaque et la chute des résistances vasculaires pulmonaires soient souhaitables après une chirurgie cardiaque, la chute des résistances systémiques est toutefois à éviter, plusieurs de ces patients étant sous traitement vasopresseur. Des études récentes rapportent l'utilisation de milrinone inhalée comme traitement de l'hypertension pulmonaire. Haraldsson démontre que l'utilisation de milrinone inhalée et de milrinone inhalée associée aux prostaglandines inhalées chez des patients atteints d'hypertension pulmonaire avant une chirurgie cardiaque diminuaient les résistance vasculaires pulmonaires sans engendrer d'hypotension systémique.¹⁵⁷ L'addition de prostaglandine inhalée à la milrinone contribue de façon additive à la chute de résistance vasculaire pulmonaire. Cet auteur démontre aussi que l'effet est réversible et persiste environ 20 minutes.

Lors de dysfonction de l'endothélium vasculaire pulmonaire, la synthèse de NO est diminuée et plusieurs systèmes peuvent jouer le rôle de vasodilatateurs accessoires pour maintenir un équilibre vasomoteur palliant ainsi partiellement au déficit en NO. La prostacycline est une des molécules qui contribuent à cet équilibre. En augmentant la concentration d'AMPc dans la cellule musculaire lisse, elle entraîne une vasodilatation indépendante du NO.

L'utilisation de CEC entraîne une dysfonction endothéliale et une chute de la synthèse de NO. Lors de la circulation extracorporelle, les niveaux sériques de PGI₂ sont augmentés et chutent en période post opératoire.¹⁵⁸ Cette chute de concentration coïncide avec la hausse de résistance pulmonaire qui suit la CEC. Fortier et al. a démontré que l'administration de prostacycline inhalée

avant la CEC pouvait limiter le dommage endothélial infligé par la CEC dans un modèle porcin. Le mode d'action de la prostacycline étant d'augmenter, par l'activation de l'adénylate cyclase, la concentration d'AMPc dans la cellule musculaire lisse, l'utilisation de milrinone pourrait, en limitant la dégradation de l'AMPc, avoir un effet similaire. La milrinone pourrait aussi par une inhibition (partielle) de la dégradation du GMPc, molécule finale de la cascade du NO, amplifier la réponse aux quantités limitées de NO.

Chapitre II

Hypothèses et buts

La dysfonction pulmonaire suivant la CEC se manifeste par de l'hypertension pulmonaire, une oxygénation diminuée, une dysfonction ventriculaire droite et par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium *in vitro*. Les relaxations dépendantes des récepteurs couplés aux protéines Gi semblent touchées plus précocement et plus sévèrement que la voie dépendante des protéines Gq. Nous avons pu améliorer, par la ventilation pendant la CEC chez le porc, une partie de la dysfonction pulmonaire jusqu'à normaliser certains de ces paramètres. Toutefois, la ventilation pendant la CEC peut parfois gêner le champ chirurgical. Ainsi, prenant compte des récents succès suite à l'utilisation de sildenafil dans l'hypertension pulmonaire, nous tenterons de définir l'effet de ce médicament sur l'arbre vasculaire pulmonaire pendant la CEC et son effet sur la relaxation dépendante de l'endothélium.

D'autre part, l'utilisation de milrinone pourrait aussi s'avérer utile en potentialisant les voies vasodilatatrices accessoires en augmentant la concentration d'AMPc dans le muscle lisse vasculaire pulmonaire. Nous étudierons donc l'effet de son administration avant la CEC sur les paramètres hémodynamiques, l'oxygénation et sur les relaxations d'artères pulmonaires *in vitro*.

Chapitre III

Corps de la thèse

Premier article

Intravenous sildenafil prevents the pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass.

Yoan Lamarche, MD¹. André Denault, MD². Michel Carrier, MD¹. Julie Roy, CCP³ Louis P. Perrault, MD, PhD¹

Abstract

Introduction:

Cardiopulmonary bypass (CPB) triggers a systemic inflammatory response that alters pulmonary endothelial function which can contribute to pulmonary hypertension. Several pharmacological agents have been used to reverse the endothelial dysfunction after CPB. Prostacyclin is a pulmonary vasodilator prostaglandin. Sildenafil is a type V phosphodiesterase inhibitor with a potent vasodilator effect on pulmonary vascular smooth muscle by limiting the degradation of cGMP, a second messenger of the NO pathway. The objective of this study was to compare the effects of inhaled epoprostenol (a prostacyclin analogue) and of intravenous sildenafil on the alterations of pulmonary endothelium-dependent relaxations after CPB in a porcine model.

Material and Methods:

Four groups of Landrace swine were compared: 1-control group: without CPB; 2-CPB group: 90 minutes of normothermic CPB; 3- Prostacyclin group: 90 minutes of CPB and treated with PGI₂ during CPB (continuous nebulisation with continuous positive airway until the end of the cardiopulmonary bypass); 4-Sildenafil group: After 60 minutes of reperfusion, swine were sacrificed and pulmonary arteries harvested. After contraction to phenylephrine (PE), pulmonary arterial endothelium-dependent relaxations to

acetylcholine and bradykinin were studied in standard organ chamber experiments.

Results:

CPB caused a statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (ACh). There was a significant improvement of endothelium-dependent relaxations to ACh in the sildenafil group ($p < 0.05$) and to bradykinin in the prostacyclin group when compared to the CPB group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference for endothelium-dependent relaxation to acetylcholine between the prostacyclin and the CPB groups.

Conclusions:

Intravenous sildenafil and inhaled prostacyclin administered prior to CPB prevents the occurrence of pulmonary endothelial dysfunction following CPB. These strategies may be useful in the prophylaxis of post CPB pulmonary hypertension after cardiac surgery.

1-From the Department of Surgery of the Montreal Heart Institute and Department of Pharmacology of the Université de Montréal. 2-Department of Anesthesiology. 3- Department of Perfusion, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada;

Key words: Cardiopulmonary Bypass, Pulmonary Hypertension, Sildenafil, Prostacyclin, Endothelium.

Ultramini-abstract

Cardiopulmonary bypass triggers a systemic inflammatory response that can contribute to pulmonary hypertension. Administration of inhaled prostacyclin or intravenous sildenafil before CPB in a swine model has a favorable impact on the pulmonary endothelial function.

Introduction

Cardiopulmonary bypass (CPB) induces a systemic inflammatory response that alters the majority of organ systems. The physiological alterations following CPB were recognized early after the development of CPB in the 1950s. During CPB, the blood flow is diverted from the right atrium to the CPB pump, passes through an oxygenator membrane and is pumped back into the aorta. Thus, the lungs are not perfused for the duration of CPB. At separation from CPB, lungs are reperfused and suffer from ischemia-reperfusion injury due to exposure to great amounts of free radicals. The blood being in contact with the non physiological surface of the CPB circuit, neutrophils and platelets are activated and contribute to the pulmonary damage. The "post pump syndrome" is characterized by an increase in pulmonary capillary permeability leading to decreased oxygenation and an increased pulmonary shunt ratio, measured by the alveolo-arterial gradient in O_2 ($AaDO_2$), a decrease in pulmonary compliance and an increase in the pulmonary vascular resistance¹⁵⁹. Several authors have reported the occurrence of a pulmonary arterial endothelial dysfunction following CPB¹⁶⁰ due to alterations of the endothelial integrity which can lead to pulmonary hypertension and an increase in right ventricular work. Right ventricular dysfunction following CPB carries a poor prognosis with a perioperative mortality ranging from 44% to 86%.¹⁶¹

The endothelium has an important role in regulating the vascular tone, inhibiting platelet aggregation and neutrophil adhesion through the release of several vasorelaxing substances such as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI_2), and also releases vasocontractors such as endothelin (ET-1) and thromboxanes. The ability to induce vasorelaxation can be decreased when endothelial dysfunction is present. Endothelial dysfunction can be defined as an imbalance between relaxing factors and contracting factors resulting in the loss of the normal protective role of the endothelium on the homeostasis of the

vascular wall.¹⁶² Several pharmacological agents have been used to limit the occurrence of pulmonary hypertension following cardiac surgery including intravenous nitroglycerin, intravenous milrinone, inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin.

Prostacyclin (PGI₂) is an endogenous prostaglandin derived from arachidonic acid metabolism through the cyclooxygenase pathway in the vascular endothelium. PGI₂ binds to Gs-protein coupled receptors, which, when activated, increase the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration, activating a protein kinase A which decreases the free intracellular calcium concentration. The physiological effects of PGI₂ include vascular dilatation (predominantly in resistance vessels), inhibition of endothelin secretion, of platelet aggregation and of leukocyte adhesion to the endothelial surface.

During CPB, circulating levels of PGI₂ rise above normal and decrease following separation from CPB¹⁶³, simultaneously with an increase in pulmonary artery pressure. CPB also affects pulmonary endothelial function by limiting NO bioavailability, contributing to pulmonary hypertension¹⁶⁴. PGI₂ has been used in clinical situations such as pulmonary hypertension and the adult respiratory distress syndrome (ARDS) following CPB. Intravenous infusion of PGI₂ may increase the intrapulmonary shunt and cause systemic vasodilatation that can be deleterious in hemodynamically unstable patients. Due to these systemic side effects, researchers have favored the bronchial tree as a route of administration, since the aerosolised form of PGI₂ causes a selective dilatation of the pulmonary vessels and improves right ventricular (RV) function and cardiac output without systemic hypotension encountered with the intravenous administration.

Sildenafil is a type V phosphodiesterase inhibitor used in the treatment of erectile dysfunction in males. Phosphodiesterase V inactivates cyclic

guanosine monophosphate (cGMP) synthesised by guanylate cyclase after stimulation by NO in the vascular smooth muscle. By inhibiting phosphodiesterase V, sildenafil limits the metabolism of NO end-products, thus enhancing its vasodilatory effect. Several authors have reported the use of oral sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension^{165,166,167}. Zhao *et al.* used a model of hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans after inhalation of 11% oxygen. The control group had a 50% rise in the pulmonary artery pressure, the sildenafil group (100 mg *per os*) had no pulmonary hypertension¹⁶⁷. Intravenous sildenafil was used by Shekerdeman *et al.* in a model of meconial aspiration in the pig which showed a 40% decrease in pulmonary vascular resistance, a 30% increase in cardiac output without change in oxygenation¹⁶⁸. The dosages used in most studies varied between 1 to 2 mg/kg^{169,170,171}.

The purpose of this study was to compare the effects of inhaled prostacyclin and intravenous sildenafil administered prior to CPB on pulmonary artery endothelial function.

Material and Methods

Experimental Preparation for all Groups (Anesthesia)

All experiments were performed using Landrace white swine (McGill University, Montreal, QC) of either gender, aged 8 weeks and weighing 26 +/- 2.5 kg. Animals were maintained and tested in accordance with the recommendations of the guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals issued by the Canadian Council on Animal and were approved by a local ethics committee. The piglets were fasted for 12 hours prior to surgery and sedated with intramuscular ketamine hydrochloride (25mg/kg)(Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, ON) and Xylazine (10 mg/kg)(Boehringer

Ingelheim, Burlington, ON) and induction was achieved using mask ventilation with 2% isoflurane (Abbott Laboratories Limited, St-Laurent, QC). They were subsequently intubated and mechanically ventilated with a constant oxygen and air mixture (3:2, or $\text{FiO}_2 = 0.66$) at 14 breaths/strokes/min and tidal volume of 6-8 ml/kg. Anesthesia was maintained with 1% isoflurane inhalation. Skin was prepared and draped with sterile field. Arterial and venous blood gases were measured at regular intervals and maintained within physiological limits by adjusting the ventilation rate and tidal volume. The electrocardiogram was recorded from four subcutaneous limb and one precordial electrode.

Experimental groups

Group 1 : Control (n=6)

After skin preparation, the mediastinum was exposed via a median sternotomy. 300 UI/kg heparin (Leo Pharma Inc. Ajax, ON) were given intravenously. After 1 hour of general anesthesia with 1% isoflurane, the animal was exsanguinated and the lungs harvested.

Group 2: Cardiopulmonary bypass (n=6)

After skin preparation and draping with sterile fields, the jugular vein and carotid artery were cannulated to obtain a central venous line and arterial pressure, respectively. A cystostomy was performed for urine output measurement. A median sternotomy was performed and the pericardium opened. A Swan-Ganz catheter (Edwards Lifesciences, Irving, CA) was inserted through the jugular vein to measure pulmonary artery pressure. After heparin administration (400 UI/kg), a double purse string was made on the proximal ascending aorta and a single purse string on the right atrium. A blood sample was drawn thereafter from the right atrium and proper

anticoagulation assessed using an activated coagulation time (ACT) with Hemochron 801 (Technidyne, NJ, USA). The aorta and right atrium were cannulated when ACT was superior to 300 seconds, with a 22-Fr and a 29/29-Fr double staged cannulas (DLP Inc., Grand Rapids, MI, USA), respectively. After cannulation, CPB was initiated when ACT was superior to 400 seconds. Ventilation was stopped throughout the CPB period. Anesthesia was maintained using the jugular vein line with a continuous infusion of Propofol (Pharmascience Inc. Montreal, CAN) (0.1-0.2 mg/kg/min). The CPB circuit consisted of a hollow fiber membrane oxygenator with incorporated filtered hardshell venous reservoir (Monolyth, Sorin, Irvine, CA, USA), a heater-cooler and a roller pump (Sarns 7000, Ann Harbor, Michigan, USA). The circuit was primed with Pentaspan 500 mL (10% Pentastarch, DuPont Pharma Inc, Mississauga, ON, Canada), lactated Ringer's 250 mL, heparin 5000 UI, mannitol 12.5 g and sodium bicarbonate 15 mEq. After initial stabilization, the pump flow was adjusted to maintain a cardiac index of 2.4 L/min/m^2 and assessed by venous gases to maintain mixed venous saturation over 60%. Mean systemic arterial pressure was maintained between 50 and 70 mm Hg with crystalloid (Ringer's lactate) and punctual boluses of 50 to 200 μg of neosynephrine (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The temperature was allowed to drift to 36°C . The heart was left beating, empty and no aortic cross clamping or cardioplegia were used. Before weaning of the CPB, swine were rewarmed to 38°C (normal porcine temperature). After 90 minutes of CPB, mechanical ventilation and isoflurane anaesthesia were reinstituted and CPB was weaned. Normal circulation was restored for 60 minutes, at which time the animal was exsanguinated into the cardiotomy reservoir. The beating heart and the lungs were excised "en bloc" and immediately immersed in a cold modified Krebs-bicarbonate solution (composition in mmol/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO_4 1.2, KH_2PO_4 1.2, glucose 11.1, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, and ethylenediaminetetraacetic acid 0.026).

Group 3: Cardiopulmonary bypass and inhaled prostacyclin (n=5)

The same procedure was followed as in the CPB group (group 2). The only difference was that a bolus of 2-2.5 $\mu\text{g/kg}$ of PGI_2 was given via the endotracheal tube through a nebulizer during the 30 minutes preceding the initiation of CPB (Figure 1). Ventilation was then stopped and a continuous nebulisation of PGI_2 at a rate of 0.1 $\mu\text{g/kg/min}$ with CPAP of 3cmH₂O was instituted until the end of the CPB. Before weaning of CPB, nebulisation was stopped and ventilation reinstituted. The dosages were based on review of the literature¹⁷² and our experience with this medication.^{173,174} PGI_2 (Flolan, Glaxo Wellcome, Mississauga, ON, Canada) was given as epoprostenol salt 1.5 mg dissolved in 100 mL of sterile glycine buffer for a concentration of 15 $\mu\text{g/mL}$. The drug was administered through a conventional in-line nebulizer kit (Salter Labs, Arvin, USA) connected to the inspiratory limb of the ventilator.

Group 4: Cardiopulmonary bypass with sildenafil (n=6)

The same procedure was followed as in the CPB group (group 2). The only difference was that 50 mg of sildenafil citrate (Viagra, Pfizer, Montreal, CAN) was crushed and diluted in 10 ml of saline solution and administered intravenously over 5 minutes after the administration of heparin.

Vascular Reactivity Studies

Less than 10 minutes after "en bloc" excision, the heart was removed and the primary pulmonary artery was dissected. Branches of second degree pulmonary arteries were isolated and dissected free of connective and adventitial tissue and divided into rings (4 mm wide; 16 rings per animal). All rings were placed in organ chambers (Emka technologies Inc, Paris, France) filled with 20 mL of modified Krebs-bicarbonate solution continuously heated at 37°C and oxygenated with a carbogen mixture (95% O₂ and 5% CO₂). The

rings were suspended between 2 metal stirrups with the upper 1 connected to an isometric force transducer connected to a signal amplifier and then allowed to stabilize for 30 minutes. Data were collected with a biological signal data acquisition software (IOX 1.700; Emka technologies Inc, Paris, France). Each arterial ring was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (3.5 g) as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl) 60 mmol/L at different levels of stretch (data not shown). The maximal contraction of rings was then obtained with addition of potassium chloride (KCl 60 mmol/L). After obtention of a plateau, all baths were washed twice with modified Krebs-bicarbonate solution and indomethacin (10^{-5} mmol/L; to exclude production of endogenous prostanoids) was added in each bath. After 45 minutes of stabilisation, phenylephrine (range 2×10^{-7} mol/L to 3×10^{-6} mol/L) was added to obtain a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl.

Endothelium-dependent Relaxations

The NO-mediated relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to acetylcholine (ACh, 10^{-10} to 10^{-5} mol/L; an agonist of M_2 receptors coupled to Gi-proteins) and to bradykinin (BK, 10^{-12} to 10^{-6} mol/L; an agonist of B_2 receptors coupled to Gq-proteins).

Endothelium-independent Relaxations

At the end of the experiment, endothelium-independent relaxations were studied with the use of 10^{-5} mol/L sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide donor.

Study drugs

All drugs were prepared daily. Acetylcholine, bradykinin, indomethacin, and sodium SNP were obtained from Sigma Chemical Co. (ON, Canada).

Propranolol was obtained from Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Metting, PA, USA) and phenylephrine was obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Sildenafil was obtained from Pfizer, McKesson, Montréal, QC, Canada. Prostacyclin was obtained from Glaxo Wellcome, Mississauga, ON, Canada

Statistical Analysis

All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Contractions to phenylephrine are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl (60 mmol/L). Relaxations are expressed as the percentage of the maximal contraction to phenylephrine for each ring. Two-way repeated analysis of variance (ANOVA) were performed to compare each point of the concentration-response curves between control rings and CPB rings. Student's *t* test for paired/unpaired observations was used for the comparison of the pulmonary artery pressures and the intravascular cAMP content. Statistical analysis was performed with the computer software S.A.S (Instr Inc. Cary, NC, USA). A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Vascular reactivity studies

Contractions

The amplitude of the contraction to KCl (60 mmol/L) and the concentration of PE used to obtain 50% of contraction to KCl were quantified for all groups in Table 1. The dose of PE needed to achieve 50% KCl contraction was significantly higher in the sildenafil group compared to CPB group ($p < 0.05$).

Relaxation

Endothelium-dependent Relaxation

There was a statistically significant decrease of endothelium-dependent relaxations to ACh in both the CPB and CPB plus prostacyclin groups when compared to controls ($P < .05$). However, there was no statistically significant difference between the CPB group with PGI₂ and the CPB group without PGI₂ ($P=NS$). There was a reversal of the dysfunction following treatment with sildenafil prior to CPB with the maximal relaxation to ACh being fully preserved. (Figure 1)

There was no statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxations to BK in the CPB when compared to the control group but there was a greater maximal relaxation to BK in the group with PGI₂ when compared to the CPB group ($P < .05$). There was no statistically significant difference between the PGI₂ and control groups ($P= NS$). There was no statistical difference between the sildenafil group and the control group, nor any difference between sildenafil and CPB group in the relaxation curve to BK. (Figure 2)

Endothelium-independent Relaxation

No statistically significant difference in relaxation to the SNP was observed between groups with all rings achieving 100% relaxation (data not shown).

Discussion

The aim of the present study was to document the effect of prophylactic use of intravenous sildenafil compared to inhaled PGI₂ during CPB on pulmonary arterial endothelial function. The major findings of this study are the following: 1) CPB induces a decrease in endothelium-dependent relaxations involving the ACh pathway but not to BK compared to controls; 2) PGI₂ administration causes a preservation of the maximal response of the pulmonary endothelium-dependent relaxation after stimulation with BK but no change in the ACh pathway and; 3) Animals receiving intravenous sildenafil had a partial restoration of the pulmonary vascular endothelium-dependent relaxation to ACh and no change in the BK pathway following CPB.

Endothelial dysfunction following CPB

Postoperative pulmonary hypertension frequently occurs after cardiac surgery¹⁷⁵ which may increase right ventricular work. This is clinically relevant since right ventricular dysfunction carries a poor prognosis following cardiac surgery, with a mortality ranging from 44 to 86%.¹⁷⁶ Morita et al. demonstrated in a porcine model that CPB causes a significant increase in pulmonary vascular resistance and depresses the RV function by more than 50%.¹⁷⁷ During total CPB, as used clinically, pulmonary blood flow is completely shut off and the lungs are perfused by bronchial flow alone. This state of reduced pulmonary perfusion causes ischemia reperfusion injury to the lungs at the time of weaning of CPB¹⁷⁸ which induces a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to ACh suggesting reperfusion as the cause of the endothelial dysfunction. This effect was observed in a previous study from our laboratory which showed that CPB without reperfusion did not decrease relaxations to ACh¹⁷⁹. CPB damages the

lung by other mechanisms including the activation of an inflammatory cascade and release of reactive oxygen species. Following exposure to CPB, endothelium-dependent relaxations of pulmonary arteries after stimulation of receptors coupled¹⁸⁰ to Gi proteins are reduced. Relaxations following stimulation of receptors coupled to Gq proteins are unaltered. In a sheep model, total CPB for 90 minutes followed by 60 minutes of pulmonary reperfusion markedly altered pulmonary microvascular responses to ACh and serotonin, both coupled to Gi-proteins¹⁸⁰. Serraf et al. also observed a decrease in endothelium-dependent relaxations to ACh in pulmonary artery rings of piglets undergoing 90 minutes of CPB followed by 60 minutes of lungs reperfusion when compared to shams.¹⁸¹ Nyhan and colleagues showed in a chronic canine model, that exposure to 150 minutes of CPB induced a selective Gi protein pathway endothelial dysfunction observed 4 days after CPB which normalized by 14 days¹⁸² while relaxations to BK were unimpaired. Reperfusion after CPB is followed by a massive production of reactive oxygen species¹⁸³ generated by pulmonary endothelial cells during reoxygenation after hypoxia¹⁸⁴. Oxidative injury is known to cause a functional uncoupling of the receptor/G-protein complex specific to the NO signal transduction pathway¹⁸⁵. The same observations were noted in this model, which showed alteration of endothelium-dependent relaxations to ACh and preserved relaxations to BK after CPB and reperfusion. The selective impairment of relaxations to ACh is not due to destruction or loss of endothelial cells since the relaxations to BK are preserved.

Since the endothelium is dysfunctional after CPB, the amount of NO released is reduced, reducing the bioavailability of cGMP¹⁸⁶. This creates an imbalance between contracting and dilating factors leading to vasoconstriction, pulmonary arterial hypertension and, in some cases right ventricular dysfunction. The reduction in PGI₂ levels following CPB contributes to this imbalance by causing an increased basal vascular tone and an abnormal response to vasodilating stimuli. PGI₂ loading before CPB could

attenuate the drop in the PGI₂ levels following CPB thus, lowering the basic pulmonary vascular tone. The second hypothesis was that sildenafil administration could restore the response to endothelium-dependent agonists favoring vasorelaxation by amplifying the response to lower levels of NO after inhibition of the phosphodiesterase.

Vascular reactivity studies

Contractions

A higher concentration of PE was necessary to achieve the same level of contraction in the sildenafil group compared to the CPB group. In humans, exposure to CPB is associated with an impairment of α -adrenergic responsiveness, most likely due to desensitisation of α -receptors¹⁸⁷ and may be due to hemodilution, hypothermia, the alteration of drug pharmacokinetics or increased levels of plasmatic catecholamines. The higher doses required to contract the vascular rings may reflect a relative pulmonary vasoplegia caused by the increased bioavailability of cGMP. A lower responsiveness of vascular smooth muscle cells (SMC) to contracting agents could have beneficial implications during states of lower endothelial NO production. The positive hemodynamic effects of this vasoplegia include lower pulmonary vascular resistances in the intravenous sildenafil group.

Relaxations

PGI₂ enhanced the amplitude of endothelium-dependent relaxations following stimulation by bradykinin, an agonist that binds to B₂ receptors coupled to Gq-proteins which causes release of NO and EDHF in pulmonary endothelium, but also stimulates prostacyclin release¹⁸⁸ resulting in vasodilatation independently of the pre-existing vascular tone. The present study demonstrates a relaxation of the pulmonary rings of greater amplitude with BK after *in vivo* PGI₂ administration. Classically, the BK pathway is not altered by standard CPB. The increased relaxation could increase response to

vasodilating stimuli in vivo such as shear stress, leading to a decrease in the pulmonary artery pressures.

Intravenous sildenafil partially reversed the endothelial dysfunction to ACh as maximal relaxations were similar to the controls. The restoration of the relaxations to ACh may be secondary to an increased response to lower levels of NO, resulting from the inhibition of GMPc metabolism.

Clinical relevance

Cardiopulmonary bypass is used everyday in cardiac surgery and despite a relatively low prevalence of severe postoperative pulmonary hypertension, some degree of pulmonary endothelial dysfunction most likely occurs in the majority of patients with or without clinically apparent manifestations. Since risk factors for postoperative pulmonary hypertension are well known, some subsets of patients could benefit from prophylactic use of agents to lower the risk of developing this phenomenon with its deleterious consequences. The new use presented in this study of a well known drug used recently for pulmonary hypertension in the postoperative setting is of definite clinical interest. The use of intravenous sildenafil in the prophylaxis of pulmonary hypertension could be an additional tool to prevent this important clinical problem.

Limitations

The levels of the drugs in the lung parenchyma and the plasmatic levels of sildenafil and prostacyclin were not measured, therefore the pharmacodynamics of the drug cannot be described extensively. The dosages used in this study were extrapolated from literature and from clinical use. A dose response curve should be obtained to determine the optimal dose of the two study drugs. Finally, this model was used in young, healthy 8 week-old Landrace swine which may not reflect the clinical situation of patient with

long standing cardiac and pulmonary diseases. The absence of cardioplegic arrest also differs from clinical CPB use. Intravenous sildenafil or inhaled prostacyclin may not have the same beneficial effects in patients with heart failure, coronary artery disease and preexisting pulmonary diseases. Further studies to document the hemodynamic effects of intravenous sildenafil are ongoing as well as other routes of administration.

Conclusion

Several conditions in critical care and in cardiac surgery are accompanied by pulmonary hypertension. Cardiopulmonary bypass, used every day in cardiac surgery, is associated with pulmonary endothelial dysfunction which frequently causes clinically significant pulmonary hypertension and the potential for right ventricular failure with its attendant high mortality. Use of PGI₂ and of Sildenafil, prior to CPB could reduce the risk of developing pulmonary hypertension, especially in high risk individuals.

Figures Legend

Figure 1:

Rings of porcine pulmonary with endothelium. X-axis: Log ACh (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ Control vs CPB, ** $p < 0,05$ Control vs PGI2, *** $p < 0,05$ CPB vs PGI2, \$ $p < 0.05$ Control vs Sildenafil, & $p < 0.05$ CPB vs Sildenafil, # $p < 0.05$ PGI2 vs Sildenafil

Figure 2:

Rings of porcine pulmonary with endothelium. X-axis: Log BK (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$ Control vs CPB, ** $p < 0,05$ Control vs PGI2, *** $p < 0,05$ CPB vs PGI2, \$ $p < 0.05$ Control vs Sildenafil, & $p < 0.05$ CPB vs Sildenafil, # $p < 0.05$ PGI2 vs Sildenafil

Table 1 :

Contractile responses to a depolarizing physiological solution containing 60 mM KCl and concentration of PE required to achieve 50% of KCl-induced contraction of pulmonary arteries isolated from control pigs (n=6) and pigs that underwent CPB (n=6) with or without previous inhaled prostacyclin (n=6) or intravenous sildenafil (n=6). Data expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ sildenafil vs CPB.

	Control	CPB	PGI2	Sildenafil
KCL (g)	5.1 \pm 0.3	3.9 \pm 2.2	6,1 \pm 0,3	4,2 \pm 0,3
PE (g)	3,0 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	4,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2
Dose PE (x 10 ⁻⁷ M)	5.5 \pm 0.9	7.0 \pm 9.6	6,5 \pm 0,6	11.9 \pm 1,5*

Figure 1:

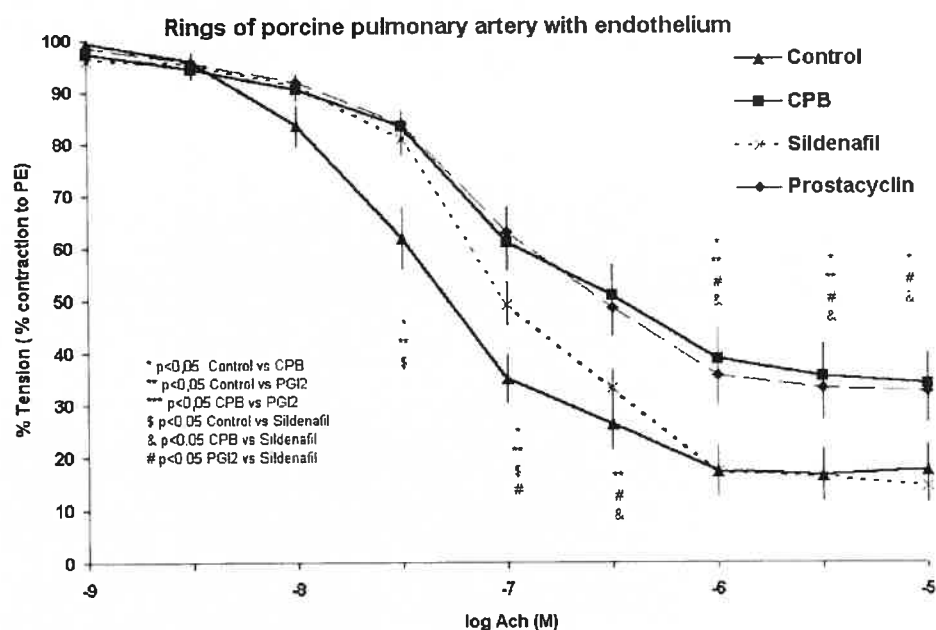
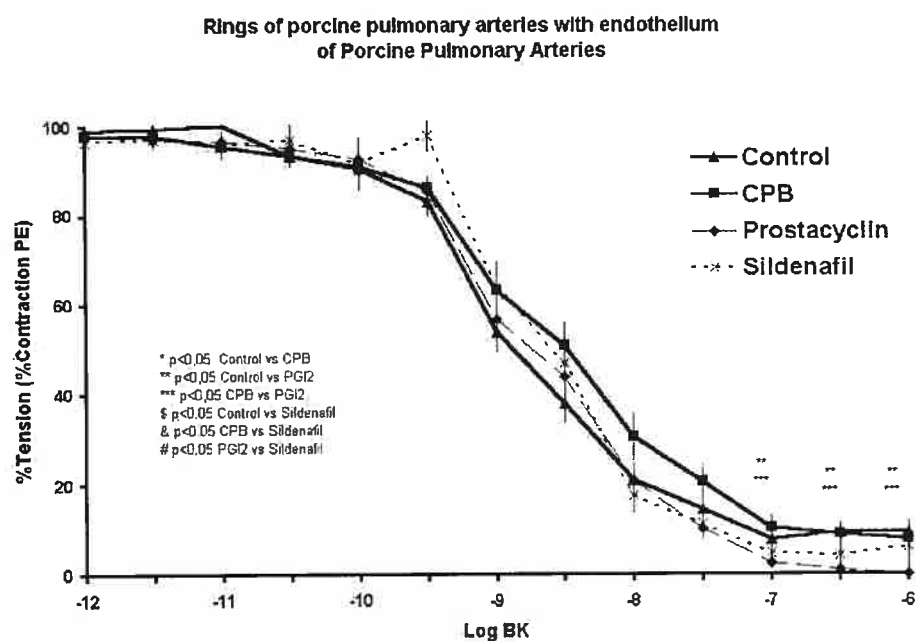


Figure 2



Chapitre III

Corps de la thèse

Deuxième article

Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following CPB

Yoan Lamarche, MD¹. Malo O, MSc¹. Éric Thorin, PhD¹. André Denault, MD². Michel Carrier, MD¹. Julie Roy, CPP³. Louis P. Perrault, MD, PhD¹

Abstract

Introduction:

Cardiopulmonary bypass (CPB) triggers a systemic inflammatory response that alters pulmonary endothelial function which can contribute to pulmonary hypertension. Several agents have been used to reverse pulmonary endothelial dysfunction after CPB. Among these agents, milrinone is a type III phosphodiesterase inhibitor with a potent vasodilator effect on pulmonary vascular smooth muscle by limiting the degradation of cAMP, a second messenger of the prostacyclin pathway. The role of milrinone in preventing pulmonary endothelial dysfunction is unexplored. The objective of this study was to compare the effects of inhaled and intravenous milrinone on the alterations of pulmonary endothelium-dependent relaxations, hemodynamic and oxygenation parameters after CPB in a porcine model.

Material and Methods:

Four groups of Landrace swine were compared: 1-control group: no CPB; 2-CPB group: 90 minutes of normothermic CPB and 60 minutes reperfusion; 3-Inhaled milrinone : 90 minutes of CPB and 60 minutes reperfusion, preceded by inhaled milrinone; 4- Intravenous milrinone group: 90 minutes of CPB and 60 minutes reperfusion, preceded by intravenous milrinone. After 60 minutes of reperfusion, swine were sacrificed and pulmonary arteries harvested. After contraction to phenylephrine, pulmonary arterial

endothelium-dependent relaxations to acetylcholine and bradykinin were studied in standard organ chamber experiments.

Results:

Inhaled milrinone caused less hypotension ($p < 0.05$) and a lesser decrease in peripheral vascular resistances ($p < 0.01$) than intravenous milrinone. The heart rate was significantly lower in the inhaled milrinone group than in the CPB with intravenous milrinone group ($p < 0.05$). Intravenous milrinone caused a significant increase in the alveolo-arterial oxygen gradient post CPB ($p < 0.01$). CPB caused a statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (ACh). The decrease in the endothelium-dependent relaxations to ACh was prevented by inhaled milrinone ($p < 0.05$) and relaxations to BK were improved in the inhaled milrinone group ($p < 0.05$) compared to CPB alone and controls. Endothelium-independent relaxations to sodium nitroprussiate were unaltered by CPB.

Conclusions:

Inhaled milrinone prevents the occurrence of the pulmonary endothelial dysfunction following CPB. The hemodynamic and oxygenation profiles obtained with inhaled milrinone are safer than with intravenous milrinone. These strategies may be useful in preventing post CPB pulmonary hypertension after cardiac surgery.

1-From the Department of Surgery of the Montreal Heart Institute and Department of Pharmacology of the Université de Montréal. 2-Department of Anesthesiology. 3- Department of Perfusion, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada;

Key words: Cardiopulmonary Bypass, Pulmonary Hypertension, Milrinone, Inhalation, Endothelium.

Ultramini-abstract

Cardiopulmonary bypass triggers a systemic inflammatory response that can contribute to pulmonary hypertension. Administration of inhaled milrinone before during CPB in a swine model has a favorable impact on the pulmonary endothelial function, hemodynamics and oxygenation comparing to intravenous milrinone via an increase of the cAMP content of pulmonary.

Introduction

Cardiopulmonary bypass (CPB) induces a systemic inflammatory response that affects all organ systems. The physiological alterations following CPB were recognized early after the development of CPB in the 1950s. The "post pump syndrome" is characterized by an increase in pulmonary capillary permeability leading to a decreased oxygenation and an increased alveolo-arterial oxygen gradient ($AaDO_2$) and a decrease in the pulmonary compliance, and increase in pulmonary vascular resistance^{189,190}. Amongst the most important repercussions of the inflammatory cascade are on the pulmonary vasculature. During CPB, blood flow is diverted from the right atrium to the CPB pump, goes through an oxygenator membrane and is pumped back into the aorta, thus, the lungs are minimally perfused during CPB. At separation from CPB, the lungs are reperfused and suffer from ischemia-reperfusion injury due to exposure to large amounts of free radicals. Due to the contact of the blood elements with the non physiological surface of the bypass circuit, neutrophils and platelets are activated and contribute to pulmonary damage which triggers an endothelial dysfunction following CPB^{191,192}. After CPB, the damage to the pulmonary endothelium can lead to pulmonary hypertension, leading to an increase in right ventricular work. Right ventricular dysfunction following CPB carries a poor prognosis with a perioperative mortality ranging from 44% to 86%¹⁹³.

The endothelium has an important role in regulating the vascular tone, inhibiting platelet aggregation and neutrophil adhesion by releasing several vasorelaxing substances as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI_2), and vasoconstrictors as endothelin (ET-1) and thromboxanes. The ability to induce vasorelaxation can be decreased when endothelial dysfunction is present. Endothelial dysfunction is defined as an imbalance between relaxing factors and contracting factors, and results in the loss of the normal protective role of the endothelium on the homeostasis of the vascular wall.¹⁹⁴ Several

pharmacological agents have been used to limit the rise in pulmonary vascular resistance and the pulmonary hypertension following cardiac surgery including intravenous nitroglycerin, intravenous milrinone, inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin¹⁹⁵.

Milrinone is a phosphodiesterase III inhibitor. Since phosphodiesterase III metabolizes cAMP (Figure 1), milrinone increases intracellular levels of cAMP. The systemic effects of milrinone include positive cardiac inotropy and systemic vasorelaxation by lowering intracellular calcium. Milrinone is used in cardiac surgical patients to treat low cardiac output states and pulmonary hypertension. When given intravenously, milrinone decreases systemic vascular resistances, causing hypotension, which can be hazardous in the hours following cardiac surgery and may necessitate vasopressor drugs. The use of inhaled milrinone has recently been described by Haraldsson et al.¹⁹⁶ in order to avoid the systemic hypotension associated with IV milrinone. They observed that inhaled milrinone lowered the pulmonary artery pressures and was not associated with systemic hypotension, however, inhaled milrinone was not compared to IV milrinone and the effect on pulmonary endothelial function was not explored. In a recent randomized controlled trial comparing the use of intravenous milrinone to placebo in congestive heart failure patients, IV milrinone lowered the systemic arterial pressure and accelerated the heart rate but there was no clinical benefit compared to placebo¹⁹⁷. The aim of the present study was to compare the effects of inhaled and intravenous milrinone in a swine model of cardiopulmonary bypass on pulmonary endothelial function, hemodynamics and oxygenation. The levels of cyclic AMP were also compared to document the mechanism of action of the drug.

Material and Methods

Experimental Preparation for all Groups (Anesthesia)

All experiments were performed using Landrace swine (McGill University, Montreal, QC) of either gender, aged 8 weeks and weighing 25 ± 3 kg. Animals were maintained and tested in accordance with the recommendations of the guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals issued by the Canadian Council on Animal and were approved by a local ethics committee. The piglets were fasted for 12 hours prior to surgery and were sedated with intramuscular ketamine hydrochloride (25mg/kg) (Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, ON) and Xylazine (10 mg/kg) (Boehringer Ingelheim, Burlington, ON). Induction was achieved using mask ventilation with 2% isoflurane (Abbott Laboratories Limited, St-Laurent, QC). They were subsequently intubated and mechanically ventilated with a constant oxygen and air mixture (3:2, or $FiO_2 = 0.66$) at 14 breaths strokes/min and tidal volume of 6-8 ml/kg. Anesthesia was maintained with 1% isoflurane inhalation. Skin was prepared and draped with sterile field. Arterial and venous blood gases were measured at regular intervals and maintained within physiological limits by adjusting ventilation rate and tidal volume. The electrocardiogram was recorded from four subcutaneous limb and one precordial electrodes.

Experimental groups

Group 1 : Control (n=6)

After skin preparation, the mediastinum was exposed via a median sternotomy. 300 UI/kg heparin (Leo Pharma Inc. Ajax, ON) were given

intravenously. After 1 hour of general anesthesia with 1% isoflurane, the animals were exsanguinated and the lungs harvested.

Group 2: Cardiopulmonary bypass (90 minutes, 60 minutes reperfusion) (n=6)

After skin preparation and draping with sterile fields, the jugular vein and carotid artery were cannulated to obtain a central venous line and arterial pressure, respectively. A cystostomy was performed for a measurement of the urine output. A median sternotomy was performed and the pericardium opened for heart exposure. A Swan-Ganz catheter (Edwards Lifesciences, Irving, CA) was inserted through the jugular vein to measure pulmonary artery pressure. After heparin administration (400 UI/kg), a double purse string was made on the proximal ascending aorta and a single purse string on the right atrium. A blood sample was drawn thereafter from the right atrium and proper anticoagulation assessed using an activated coagulation time (ACT) with Hemochron 801 (Technidyne, NJ, USA). The aorta and right atrium were cannulated when ACT was superior to 300 seconds, with a 22-Fr and a 29/29-Fr double staged cannulas (DLP, Inc., Grand Rapids, MI, USA), respectively. After cannulation, CPB was initiated when ACT was superior to 400 seconds. Ventilation was stopped throughout the CPB period. Anesthesia was maintained using the jugular vein line with a continuous infusion of Propofol (Pharmascience Inc. Montreal, QC) (0.1-0.2 mg/kg/min). The CPB circuit consisted of a hollow fiber membrane oxygenator with incorporated filtered hardshell venous reservoir (Monolyth, Sorin, Irvine, CA, USA), a heater-cooler and a roller pump (Sarns 7000, Ann Harbor, Michigan, USA). The circuit was primed with Pentaspan 500 mL (10% Pentastarch, DuPont Pharma Inc, Mississauga, ON, Canada), lactated Ringer's 250 mL, heparin 5000 UI, mannitol 12.5 g and sodium bicarbonate 15 mEq. After initial stabilization, the pump flow was adjusted to maintain an index of 2.4

L/min/m² and assessed by venous gases to maintain mixed venous saturation over 60%. Mean systemic arterial pressure was maintained between 50 and 70 mm Hg with Ringer's lactate and punctual boluses of 50 to 200 µg of neosynephrine (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The temperature was allowed to drift to 36°C. The heart was left beating, empty. No aortic cross clamping or cardioplegia was used. Before CPB weaning, swine were rewarmed to 38°C (normal porcine temperature). After 90 minutes of CPB, mechanical ventilation and isoflurane anaesthesia were reinstituted and CPB was weaned. Normal circulation was restored for 60 minutes, at which time the animal was exsanguinated into the cardiotomy reservoir. The heart and the lungs were excised "en bloc" and immediately immersed in a cold modified Krebs-bicarbonate solution (composition in mmol/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11.1, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, and ethylenediaminetetraacetic acid 0.026).

Group 3: Cardiopulmonary bypass and inhaled milrinone(n = 6)

The same procedure was followed as in the CPB group (group 2) with the addition of a bolus of 1.8 mg (60-90µg/kg) of milrinone (Primacor, Sanofi-Synthelabo Canada Inc. Markham, ONT.) was given via the endotracheal tube through a nebulizer during the 15 minutes preceding the initiation of CPB (Figure 1). Milrinone was given as a dilution of 2 mg of milrinone 1 mg/ml diluted in 8 ml of normal saline (200µg/ml). The drug was administered through a conventional in-line nebulizer (Salter Labs, Arvin, USA) connected to the inspiratory limb of the ventilator. Ventilation was stopped and a continuous nebulization of milrinone at a rate of 0.08-0.11 µg/kg/min with CPAP of 3 cm H₂O was then instituted until the end of the CPB. Before weaning of CPB, nebulization was stopped and ventilation reinstituted.

Group 4: Cardiopulmonary bypass with intravenous milrinone (n=3)

The same procedure was followed as in the CPB group (group 2) with addition of a 2 mg (67-100 μ g/kg) bolus of milrinone was diluted in 10 ml of saline solution and administered intravenously over 15 minutes after the administration of heparin before the institution of CPB.

Hemodynamic and Biochemical Data

The heart rate was continuously monitored from 5 subcutaneous limb electrodes. Arterial and venous blood gases were measured at regular intervals during the experiment (baseline, during CPB at 15, 45 and 75 minutes, and at 30 and 60 minutes after weaning from CPB) and maintained within physiological limits by adjusting the ventilation rate and tidal volume. Hemodynamic parameters including mean arterial pressure, heart rate, mean pulmonary artery pressure, central venous pressure and pulmonary artery wedge pressure were measured with a Swan-Ganz catheter at different time intervals during the procedure: after induction, after drug administration and after weaning of CPB (30 minutes and 60 minutes).

Vascular Reactivity Studies

Less than 10 minutes after "en bloc" excision, the heart was removed and the primary pulmonary artery was dissected. Branches of second degree pulmonary arteries were isolated and dissected free of connective and adventitial tissue and divided into rings (4 mm wide; 16 rings per animal). All rings were placed in organ chambers (Emka technologies Inc, Paris, France) filled with 20 mL of modified Krebs-bicarbonate solution continuously heated at 37°C and oxygenated with a carbogen mixture (95% O₂ and 5% CO₂). The

rings were suspended between 2 metal stirrups with the upper one connected to an isometric force transducer connected to a signal amplifier and then allowed to stabilize for 30 minutes. Data were collected with a biological signal data acquisition software (IOX 1.700; Emka technologies Inc, Paris, France). Each arterial ring was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (3.5 g) as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl) 60 mmol/L at different levels of stretch. The maximal contraction of rings was then obtained with addition of potassium chloride (KCl 60 mmol/L). After obtention of a plateau, all baths were washed twice with modified Krebs-bicarbonate solution and indomethacin (10^{-5} mmol/L; to exclude production of endogenous prostanoids) was added in each bath. After 45 minutes of stabilisation, phenylephrine (range 2×10^{-7} mol/L to 3×10^{-6} mol/L) was added to obtain a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl.

Endothelium-dependent Relaxations

The NO-mediated relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to acetylcholine (ACh, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L; an agonist of M_2 receptors coupled to Gi-proteins) and to bradykinin (BK, 10^{-12} to 10^{-6} mol/L; an agonist of B_2 receptors coupled to Gq-proteins).

Endothelium-independent Relaxations

At the end of the experiment, endothelium-independent relaxations were studied with the use of 10^{-5} mol/L sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide donor.

Study drugs

All drugs were prepared daily. Acetylcholine, bradykinin, indomethacin, and SNP were obtained from Sigma Chemical Co. (ON, Canada). Propranolol was obtained from Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA) and phenylephrine was obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Milrinone was obtained from Sanofi Synthelabo (Markham, ON, Canada).

Determination of Pulmonary Artery Intravascular Cyclic AMP Content

To determine the vascular cyclic AMP content of porcine pulmonary arteries, rings from the 4 groups were collected after sacrifice, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C . At the time of analysis, all segments were pulverized in a liquid nitrogen-cooled stainless steel mortar, and then transferred in trichloroacetic acid solution (TCA; 6.25% w/v). The acid extracts were then centrifuged at 4°C for 15 minutes at $12,000 \times g$ (3000 RPM) to precipitate cell debris and proteins. The pellets were used for total protein determination using the Bradford microassay technique (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). To remove trichloroacetic acid, the supernatants were extracted 4 times with water-saturated diethyl ether. Any residual diethyl ether was removed by heating the samples to 90°C for 3-5 minutes. Cyclic AMP quantitation was done using an enzyme immunoassay (EIA) system with acetylation based on rabbit anti-cAMP antibodies (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). The amount of cyclic AMP in each blood vessel ring was standardized to $\text{pmol cyclic AMP} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein.

Statistical Analysis

All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Contractions to phenylephrine are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl (60 mmol/L). Relaxations are expressed as the percentage of the maximal contraction to phenylephrine for each ring. Two-way repeated analysis of variance (ANOVA) were performed to compare each point of the concentration-response curves between control rings and CPB rings. Student's *t* test for paired/unpaired observations was used for the comparison of the pulmonary artery pressures and the intravascular cAMP content. Statistical analysis was performed with the computer software S.A.S (Instr Inc. Cary, NC, USA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Hemodynamic and biochemical data

Effect of the Milrinone bolus (inhaled or intravenous)

Inhaled and intravenous milrinone reduced MAP. There was a more important decrease ($p < 0.05$) in the intravenous milrinone group (55 ± 6 mmHg) compared to the inhaled group (60 ± 10 mm Hg) from a pre-administration MAP of 75 ± 10 mm Hg. A decrease in systemic vascular resistance from 38 ± 6 to 23 ± 5 dynes \times sec/ $\text{cm}^5 \times \text{m}^2$) in the intravenous milrinone group was observed while the SVR did not change in the inhaled milrinone group. ($p < 0.01$)

Hemodynamic data during and after bypass

Blood pressure and cardiac index

In the CPB group, the mean arterial pressure and cardiac index were stable throughout the study period except 30 minutes after weaning of CPB, when there was an increase in systemic blood pressure ($p < 0.05$) (Figure 2) and cardiac index ($p < 0.01$) (Figure 3). Inhaled and intravenous milrinone blunted the peak observed 30 minutes after the end of bypass.

Heart rate

There was a non significant ($p = 0.13$) increase in the heart rate during the bypass run in the CPB group (Figure 4). The heart rate was increased ($p < 0.05$) in the intravenous milrinone group compared to the CPB group and reached statistical significance only after 75 minutes on bypass ($p < 0.05$). The heart

rate was significantly lower in the inhaled milrinone group compared to the CPB and IV milrinone groups at 15, 45 and 75 minutes on CPB and at 30 and 60 minutes post CPB ($p < 0.05$).

Oxygen exchanges

The alveolo-arterial oxygen gradient was significantly greater in the intravenous milrinone group 60 minutes after bypass ($p < 0.05$) (Figure 5) compared to the CPB and inhaled milrinone groups. Oxygen exchanges were not different in the inhaled milrinone and in the CPB group.

There was no statistical difference in pulmonary artery pressures during the experiment within or between the groups (data not shown).

Vascular reactivity studies

Contractions

The amplitude of contraction induced by KCl (60 mmol/L) was similar in all groups (Table 1). The concentration of PE necessary to reach 50% of the contraction induced by 60 mmol/l KCl was greater in the inhaled milrinone group compared to controls ($p < 0.05$) and to intravenous milrinone group ($p < 0.01$).

Relaxation

CPB induced an endothelial dysfunction as suggested by the reduced potency and efficacy of ACh ($P < 0.05$) (Figure 6). This dysfunction was prevented by inhaled milrinone ($P < 0.05$) but not intravenous milrinone.

BK-induced relaxations were also altered by CPB (Figure 7). Inhaled milrinone increased relaxation to BK compared to all other groups ($P < 0.05$). In addition, no statistically significant differences in relaxation to SNP were

observed between groups, with all rings achieving 100% relaxation (data not shown).

Cyclic AMP measurements

The cAMP content was significantly lower in the CPB group than in the controls ($p < 0.05$). The cAMP content in the intravenous milrinone group was similar to controls. The inhaled milrinone group had a higher content of cAMP than the CPB group but less than the CPB and the intravenous milrinone groups ($p < 0.05$) (Figure 8)

Discussion

The aim of this study was to compare the effects of preoperative inhaled and intravenous milrinone on the endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by CPB. The major findings of this study are that 1) CPB induces a pulmonary endothelial dysfunction of the ACh (an agonist of M_2 receptor coupled to G_i proteins) and BK (an agonist of B_2 receptors coupled to G_q protein) pathways that is reversed by administration of inhaled, but not intravenous, milrinone prior to CPB. 2) Inhaled milrinone is associated with better hemodynamic and oxygenation profiles than intravenous milrinone with less hypotension, a lower heart rate and a lesser reduction in systemic vascular resistances. 3) intravenous milrinone causes an increase in the alveolo-arterial oxygen gradient.

These observations suggest that the administration of inhaled milrinone before cardiopulmonary bypass prevents pulmonary endothelial dysfunction with a superior pharmacodynamic profile than intravenous milrinone. These observations conquer with the clinical observations that inhaled milrinone prevents pulmonary hypertension (Haraldsson) in cardiac surgery.

Cardiac surgery with CPB can be associated with the occurrence of pulmonary hypertension (PH). Patients undergoing mitral valve surgery and coronary artery bypass grafting (CABG) with left ventricular dysfunction frequently present to the hospital with various degrees of preexisting PH and are prone to develop this complication in the postoperative setting.¹⁹⁸ Pulmonary hypertension increases right ventricular work, which can lead to right ventricular dysfunction which carries a poor prognosis with a perioperative mortality ranging from 44% to 86%^{6,199}. Morita and colleagues have demonstrated in a porcine model that CPB causes a significant increase in pulmonary vascular resistance and depresses the RV function by more than 50%.²⁰⁰ Pulmonary artery endothelial dysfunction due to a decrease in the production or increased degradation of relaxing factors, results in pulmonary hypertension, leading to RV dysfunction and low cardiac output syndrome²⁰¹. Consequently, prevention of pulmonary hypertension after CPB is of utmost clinical importance particularly in patients with pre-existing pulmonary hypertension.

Two modes of administration of the frequently used drug milrinone were compared in a model using CPB. To date, only one study had reported the use of inhaled milrinone after cardiac surgery²⁰². So far no experimental study had been performed in a relevant animal model comparing two modes of administration of milrinone in a reproducible swine model of CPB associated with postoperative pulmonary endothelial dysfunction.²⁰³

In this study, the doses of phenylephrine used to contract pulmonary arteries were higher in the inhaled milrinone group than in the control and in intravenous milrinone groups. These higher doses may reflect a relative pulmonary vasoplegia caused by an increased bioavailability of cAMP (Figure 8). A lesser response of vascular smooth muscle cells (SMC) to contracting agents could have beneficial implications in states of lower endothelial NO

production as observed with the lower pulmonary vascular resistance in the inhaled milrinone group. The reductions in pulmonary resistance and right-sided afterload observed in the inhaled milrinone group are the likely causes of the observed increased stroke volume which is a favourable event in the post operative setting.

The impairment of ACh and BK-induced endothelium-dependent relaxations in the CPB group compared to controls was prevented by inhaled milrinone but not by intravenous milrinone. Milrinone increases cAMP levels in smooth muscle cells and possibly endothelial cells. cAMP causes vasorelaxation by lowering intracellular calcium levels, limiting vascular smooth muscle contraction. The present experiments were performed in the absence of PGI₂ production, due to use of indomethacin. Consequently, the increased relaxations are most likely due to an increased NO production or an augmented smooth muscle response to NO. Fortier et al recently showed that the use of inhaled PGI₂ prior to CPB increased endothelium-dependent relaxations to BK suggesting that increased cAMP levels enhance the production of NO by the endothelium or sensitizes smooth muscle cells. Niwano et al described a cAMP responsive element (CRE) in the eNOS promoter by using Beraprost, a PGI₂ receptor agonist, to enhance cAMP levels, which increased eNOS expression and enhanced NO bioavailability²⁰⁴. Hence, by augmenting cAMP levels, milrinone may promote endothelial NO production, while selective administration in the pulmonary tree limits the systemic side effects.

The speculative reasons why the two modes of administration of milrinone achieved different effects on endothelium-dependent relaxations are numerous. Since intravenous milrinone has an important distribution volume, the precise amount of this drug reaching the lungs is unknown. Furthermore, tachycardia and hypotension could adversely affect the pulmonary endothelial function. Inhaled milrinone was administered as a bolus before initiation of

CPB and followed by a continuous nebulization throughout CPB time but the amount of milrinone reaching the lungs by nebulization was not quantified in the present experiments. Administration of milrinone by nebulization should not induce V/Q mismatch since only vessels of ventilated regions of the lung are reached by the molecule. On the other hand, intravenous milrinone caused general vasodilatation resulting in shunting and a higher AaDO₂. We believe that the initial bolus of inhaled milrinone is responsible for the majority of the effect compared to the continuous nebulization since the 3 cm H₂O PEEP applied during CPB does not favor penetration of the particules in the parenchyma. Furthermore, only 10% of the the initial dose of milrinone was nebulized over the total CPB time, corresponding to approximately 15% of the pharmacologic dose of intravenous milrinone. The effect of CPAP during CPB has been studied by Lockinger et al²⁰⁵ which showed that a 10 cm H₂O CPAP was associated with better V/Q match after CPB. However, other groups found that a CPAP of 5 cmH₂O does not prevent the post-CPB lung function impairment²⁰⁶. The PEEP used in the present experiment was lower and no changes in the AaDO₂ were observed following CPB in the inhaled milrinone group.

No significant differences were observed in pulmonary artery pressures or pulmonary vascular resistance in the different groups which could be due to the variations seen between the animals. The variations in hemodynamic parameters and the small number of animals could be responsible for the lack of statistical difference.

The smaller reduction in arterial pressure and in systemic vascular resistance in the inhaled milrinone group compared to intravenous administration is interesting since intravenous milrinone causes a significant systemic vasodilatation. Inhaled milrinone is associated with a safer profile, with lesser systemic actions.

The tachycardia associated with the CPB was prevented by inhaled milrinone while intravenous milrinone increased the heart rate compared to the CPB group alone. The decrease in myocardial oxygen demand associated with a slower heart rate is an additional advantage of inhaled milrinone.

Clinical relevance

Cardiopulmonary bypass is used everyday in cardiac surgery. Despite a relatively low prevalence of postoperative pulmonary hypertension, various degrees of pulmonary endothelial dysfunction occurs in some subsets or all of the patients with or without clinically apparent manifestations. On the other hand, risk factors for postoperative pulmonary hypertension are well known and the patients could benefit from prophylactic agents to lower their risk of developing this important complication and its deleterious consequences on right ventricular function. This article presents a new mode of administration for milrinone, a drug used for years in cardiac surgery. Inhaled milrinone is more effective and associated with less hypotension than the traditional intravenous route. In addition inhaled milrinone is not associated with alterations in oxygen exchange seen with intravenous administration and reverses the pulmonary endothelial dysfunction through prevention of ischemia reperfusion injury during CPB.

Limitations

The pharmacokinetics of the drugs in the plasma and lung parenchyma were not measured. The dose used in this study was extrapolated from the literature and our clinical experience. Further studies to determine the best timing for an inhaled milrinone bolus, namely before or after CPB are ongoing. Finally, a model using young, healthy 8 week-old Landrace swine may not allow confirmation that inhaled milrinone has similar beneficial effects in patients with CAD and preexisting pulmonary diseases.

Cardioplegic arrest was not used in these experiments but is unlikely to change the effects of CPB on pulmonary endothelial function and gas exchanges although myocardial global ischemia is known to increase inflammation.

Conclusion

This study comparing the effects of two modes of administration of milrinone in swine undergoing CPB showed that inhaled milrinone is safer and is associated with a lower heart rate throughout surgery. It completely prevented the pulmonary endothelial dysfunction and was associated with better oxygen exchanges than its intravenous administration in this pulmonary ischemia-reperfusion model. This therapy could be useful in patients at risk for postoperative pulmonary hypertension undergoing cardiac surgery and in other settings of ischemia-reperfusion injuries such as lung transplantation. Trials in patients undergoing cardiac surgery are ongoing to explore the effects of this mode of administration in the clinical arena.

Tables Legend

Table 1. Contractile responses to a depolarizing physiological solution containing 60 mM KCl and concentration of PE required to achieve 50% of KCl-induced contraction of pulmonary arteries isolated from control pigs (n=6) and pigs that underwent CPB (n=6) with or without previous inhaled (n=3) or intravenous (n=3) administration of milrinone. Data expressed as mean \pm SD * p<0.01 vs intravenous milrinone ** p<0.05 vs control

Figures Legend

Figure 1: Schematic representation of an endothelial cell and a smooth muscle cell. Ach: acetylcholine. BK: bradykinine. PGI₂: prostacyclin. cAMP: cyclic adenosin monophosphate. cGMP: cyclic guanosin monophosphate

Figure 2: Mean arterial pressure. X-axis: time, y-axis: MAP (mmHg). Data expressed as mean \pm SEM *: $p < 0.05$ CPB vs Milrinone (both groups)

Figure 3 : Cardiac index. X-axis: time, y-axis: CI (l/min/m²). Data expressed as mean \pm SEM. *: $p < 0.01$ CPB vs milrinone (both groups)

Figure 4: Heart rate. X-axis: time, y-axis: HR (bpm). Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ CPB vs Inhaled Milrinone, ** $p < 0.01$ CPB vs Inhaled Milrinone, *** $p < 0.001$ CPB vs Inhaled Milrinone, + $p < 0.05$ Inhaled vs IV Milrinone, ++ $p < 0.01$ Inhaled vs IV Milrinone, +++ $p < 0.001$ Inhaled vs IV Milrinone, # $p < 0.05$ CPB vs IV Milrinone.

Figure 5: Alveolo-arterial oxygen gradient. X-axis: time, y-axis: AaDO₂ (mmHg). Data expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.01$ IV Milrinone vs inhaled Milrinone et CPB

Figure 6: Rings of porcine pulmonary with endothelium. X-axis: Log ACh (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ CPB vs Inhaled Milrinone, ** $p < 0.01$ CPB vs Inhaled Milrinone, *** $p < 0.001$ CPB vs Inhaled Milrinone, + $p < 0.05$ Inhaled vs IV Milrinone, ++ $p < 0.01$ Inhaled vs IV Milrinone, \$ $p < 0.05$ Control vs CPB, \$\$ $p < 0.01$ Control vs CPB, \$\$\$ $p < 0.001$ Control vs CPB, ? $p < 0.05$ control vs IV Milrinone, ?? $p < 0.05$ control vs IV Milrinone.

Figure 7: Rings of porcine pulmonary with endothelium. X-axis: Log BK (M). Y-axis: Tension (% contraction to PE). PE: phenylephrine. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ CPB vs Inhaled Milrinone, ** $p < 0.01$ CPB vs Inhaled Milrinone, + $p < 0.05$ Inhaled vs IV Milrinone, ++ $p < 0.01$ Inhaled vs IV Milrinone, +++ $p < 0.001$ Inhaled vs IV Milrinone, # $p < 0.05$ CPB vs IV Milrinone, ## $p < 0.01$ CPB vs IV Milrinone, \$ $p < 0.05$ Control vs CPB, & $p < 0.05$ control vs inhaled Milrinone, && $p < 0.01$ control vs inhaled Milrinone, &&& $p < 0.001$ control vs inhaled Milrinone, ? $p < 0.05$ control vs IV Milrinone, ?? $p < 0.01$ control vs IV Milrinone, ??? $p < 0.001$ control vs IV Milrinone.

Figure 8: Concentration in cAMP in pulmonary arteries after CPB. X-axis: study groups. Y-axis: cAMP concentration (pmol/mg proteins). cAMP: cyclic adenosin monophosphate. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs CPB, + $p < 0.05$ vs Inhaled Milrinone, \$: $p < 0.05$ vs Control

Table 1

	Control	CPB	Inhaled Milrinone	IV Milrinone
KCL (g)	5.1±0.3	3.9±2.2	4.8±0.28	4.0±0.3
PE (g)	3.0±0.2	2.5±0.1	2.7±0.1	2.4±0.1
Dose PE (x 10 ⁻⁷ M)	5.5±0.9	7.0±9.6	8.3±0.93 ^{*,**}	4.1±0.3

Figure 1

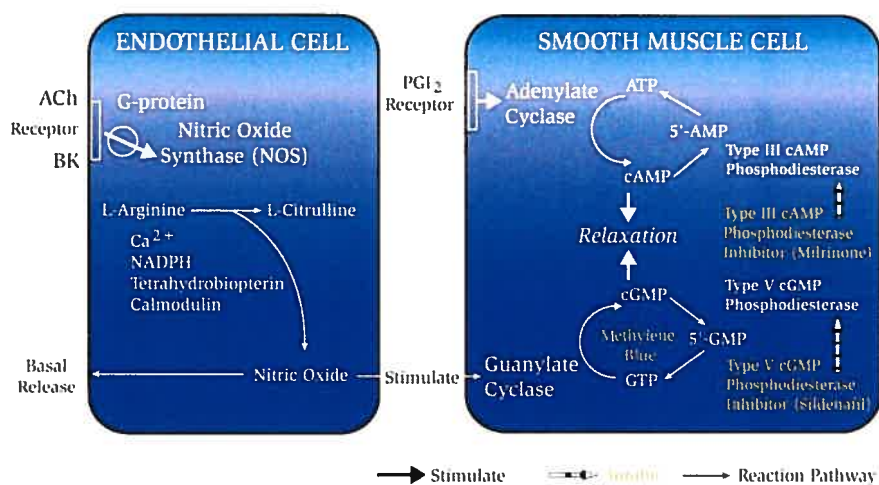


Figure 2

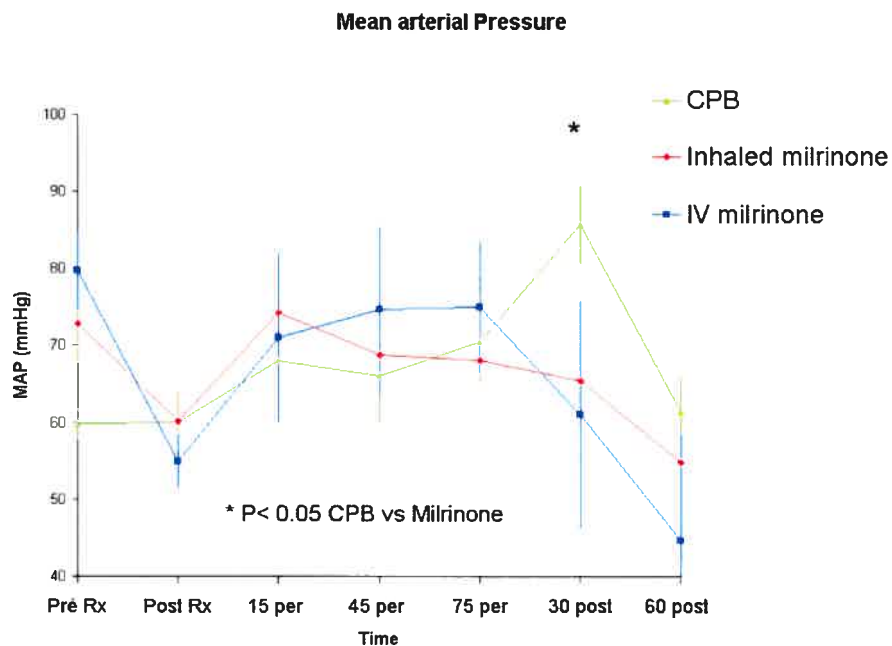


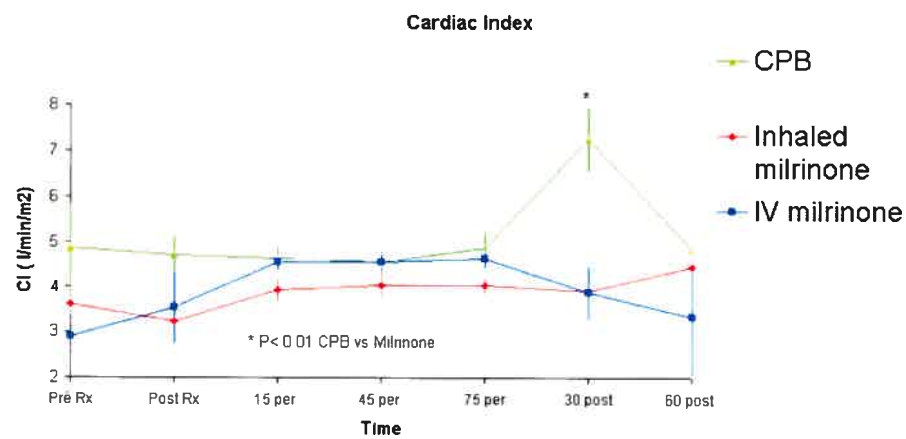
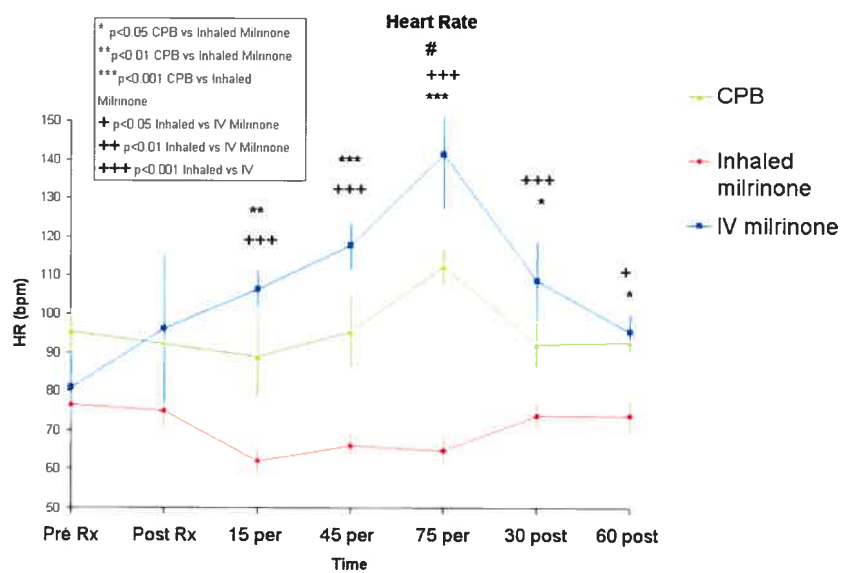
Figure 3**Figure 4**

Figure 5

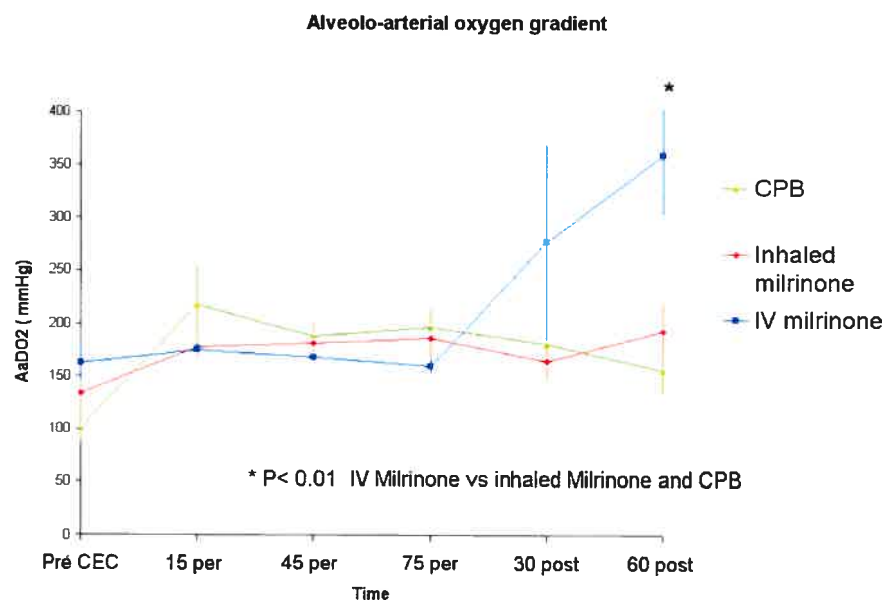


Figure 6

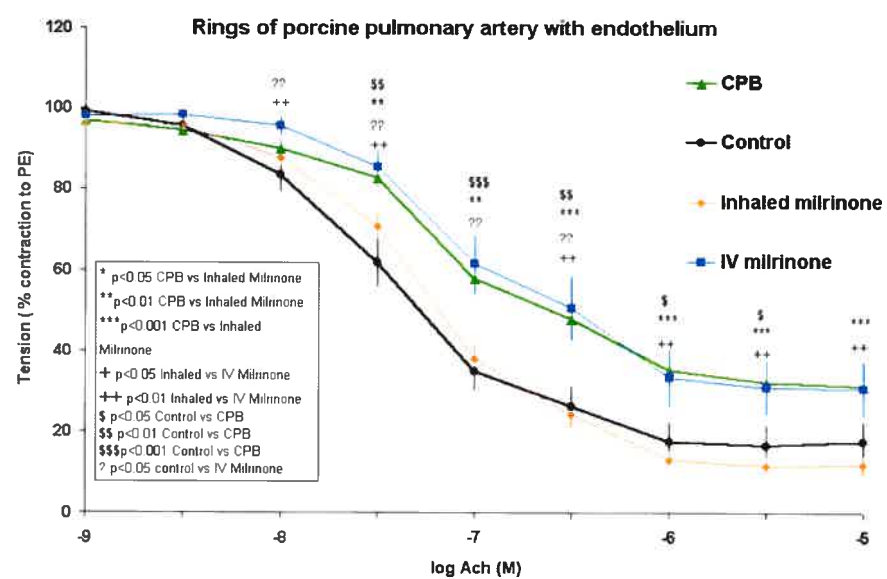


Figure 7

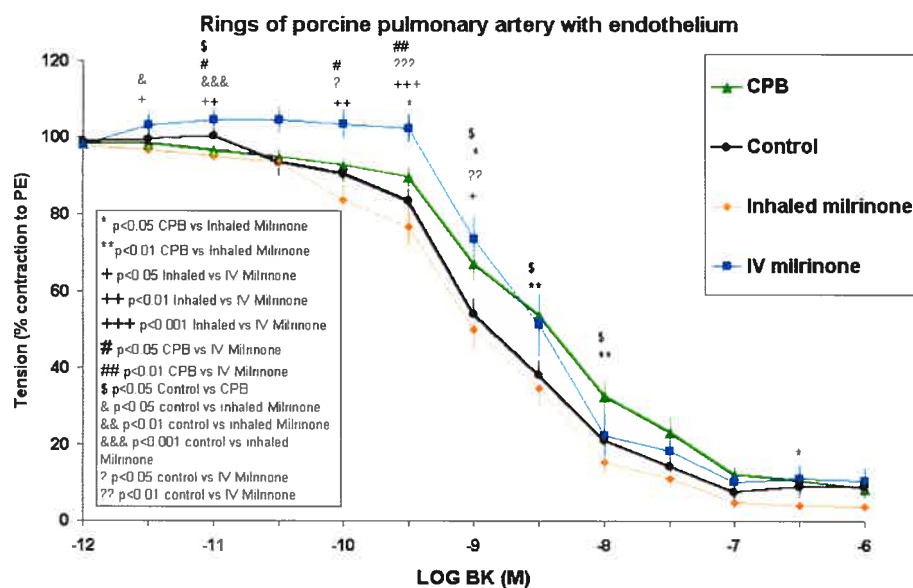
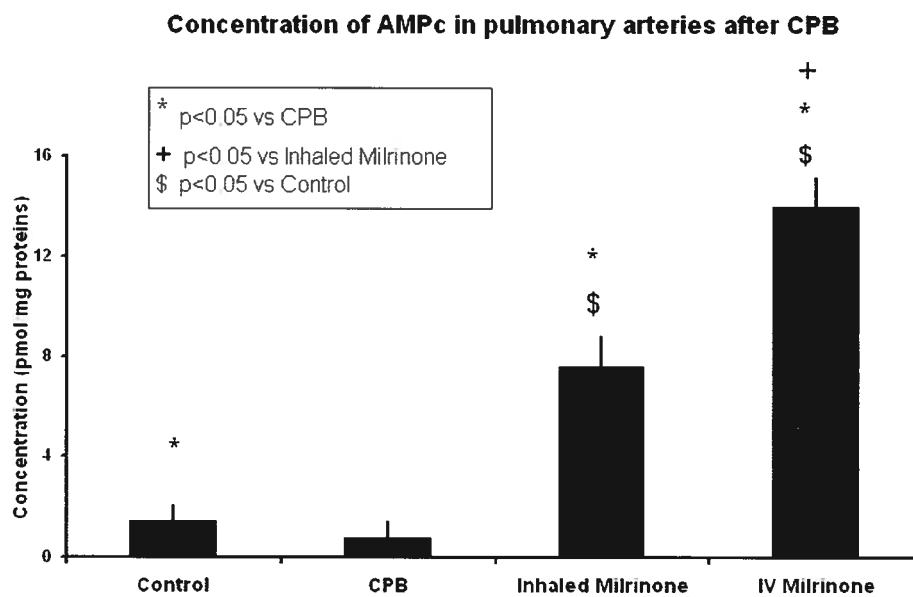


Figure 8



Chapitre IV

Discussion des résultats

L'exposition à la CEC cause un cycle d'ischémie-reperfusion au niveau des vaisseaux pulmonaires. En effet, les vaisseaux pulmonaires sont ischémiques pendant la CEC, mais suivant le sevrage de la CEC sont reperfusées ce qui cause une dysfonction endothéliale artérielle pulmonaire due en partie à une baisse de production de facteurs relaxants sécrétés par l'endothélium qui se traduit cliniquement par de l'hypertension pulmonaire. L'augmentation du travail ventriculaire droit associé à l'hypertension pulmonaire peut mener à sa défaillance, qui est associée à un mauvais pronostic. La dysfonction endothéliale pulmonaire influence donc le devenir des patients opérés en chirurgie cardiaque.

La dysfonction endothéliale est caractérisée par un défaut de production de facteurs relaxants, notamment le monoxyde d'azote (NO). La chute de production de NO entraîne une baisse de l'activité de la guanylate cyclase et secondairement une baisse de la production de GMP cyclique, qui produit normalement une relaxation du muscle lisse vasculaire. La perfusion extracorporelle est associée avec de hauts niveaux circulants d'AMP cyclique qui chutent au moment du sevrage de la CEC. La combinaison de la baisse des taux de GMP cyclique et d'AMP cyclique circulantes cause une vasoconstriction relative, avec hausse des résistances vasculaires pulmonaires, entraînant une HTP.

Les objectifs du présent travail étaient d'améliorer les relaxations dépendantes de l'endothélium suivant la CEC par un renversement ou une prévention du dommage endothélial artériel pulmonaire. Les stratégies utilisées visaient à augmenter l'apport de prostacycline et de diminuer la dégradation de l'AMPc et de la GMPc. Les médicaments testés avaient tous déjà été utilisés dans le traitement de l'hypertension pulmonaire, cependant, l'utilisation de ces médicaments dans le contexte de la chirurgie cardiaque a été peu exploré. Certaines difficultés sont associées à l'administration de ces agents, notamment, le sildenafil par voie orale qui est absorbé de façon variable par l'estomac et l'intestin. De plus, la milrinone par voie intraveineuse entraîne une vasodilatation systémique et une hypotension artérielle systémique. Pour ces raisons, des modes d'administration alternatifs potentiellement avantageux en chirurgie cardiaque ont été étudiés, spécifiquement l'administration de sildenafil intraveineux et de milrinone inhalée.

Les trouvailles principales du présent travail sont que 1) l'utilisation de PGI₂ inhalée, de milrinone inhalée ou de sildenafil intraveineux avant la CEC améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères pulmonaires suivant la reperfusion après la CEC. 2) La milrinone intraveineuse n'améliore pas les relaxations dépendantes de l'endothélium après la CEC. 3) La milrinone inhalée et le sildenafil intraveineux, tous deux inhibiteurs de la phosphodiesterase, diminuent la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux

agents vasoconstricteurs. 4) La milrinone par voie inhalée a une efficacité supérieure aux autres agents sur l'amélioration de la fonction endothéliale et est aussi associée à une baisse du travail myocardique et une meilleure oxygénation avec une sécurité d'administration plus avantageuse que par voie intraveineuse dans la période immédiate suivant la circulation extracorporelle.

Plusieurs constatations découlent de l'étude de ces médicaments. Compte tenu que plusieurs des molécules testées ont démontré une efficacité, plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour limiter la dysfonction de l'endothélium vasculaire pulmonaire après la CEC. La question reste entière à savoir quels patients bénéficieront de quelle technique? Quelle technique est la plus efficace? Et quelles seront les modalités d'administration (doses, chronologie, bolus ou en continu)? Finalement, puisque certaines des modalités thérapeutiques proposées sont nouvelles, comme le sildenafil par voie intraveineuse et la milrinone par inhalation, il n'est pas possible de recommander les formulations optimales à utiliser cliniquement à ce stade.

Milrinone inhalée

La découverte la plus intéressante du point de vue clinique concerne l'utilisation de la milrinone inhalée qui s'est avérée plus efficace et plus sécuritaire qu'en administration intraveineuse. Aucun effet secondaire n'a été observé tout en présentant un avantage en terme de dépense myocardique en

oxygène, en réduisant la fréquence cardiaque. Finalement, son utilisation était associée à une réduction des anomalies ventilation/perfusion pulmonaires avec un gradient alvéolo-artériel inférieur à ceux obtenus avec la milrinone intraveineuse témoignant d'une oxygénation supérieure.

Les expériences ont été effectuées avec des CEC d'une durée de 90 minutes représentatives des durées fréquemment observées en clinique, cependant l'effet des traitements avec des durées plus longues ou plus courtes reste à déterminer. De plus, bien que les expériences ont été effectuées sur une population homogène de jeunes porcs sains, des bénéfices probants ont été démontrés dans la période immédiate suivant le sevrage de la CEC ce qui suggère un bénéfice potentiel pour l'ensemble de la population cardiaque nécessitant une chirurgie avec perfusion extracorporelle. L'effet des stratégies sur des sujets porteurs de maladies cardiopulmonaires reste à explorer.

Des études supplémentaires seront également nécessaires pour documenter l'effet de ce type d'administration sur l'arbre trachéo-bronchique. Bien qu'aucune difficulté d'oxygénation, marqueurs de lésion alvéolaire aigue, n'ait été observée dans ce modèle expérimental de circulation extracorporelle et de reperfusion pulmonaire, nous ne pouvons pas garantir l'absence de ce type de manifestation dans les heures qui suivent la chirurgie.

Perspectives de recherche future

L'utilisation inhalée de milrinone, qui n'est acceptée que par voie intraveineuse par Santé Canada a été décrite, elle fut administrée en bolus au début de la chirurgie, suivi d'une nébulisation en continu pendant la CEC. Les effets d'un bolus de milrinone inhalée avant la sortie de CEC serait à documenter en comparaison à l'administration avant la CEC qui était basée sur des expériences antérieures suggérant qu'un remplissage des stocks d'AMP cyclique pouvait être avantageux avant le début de la CEC. L'utilisation en fin de CEC présenterait plusieurs avantages potentiels dont la possibilité de cibler les patients ayant des facteurs de risque d'hypertension pulmonaire, comme les CEC de longues durées ou ceux présentant des évidences échographiques ou cliniques de dysfonction ventriculaire droite.

Nous rapportons de plus l'utilisation de sildenafil intraveineux actuellement disponible seulement par voie orale. La forme intraveineuse décrite, obtenue par la solubilisation d'un comprimé pulvérisé dans une solution saline physiologique, ne se prête pas à l'usage clinique pratique. Des discussions sont en cours avec le manufacturier du sildenafil pour mettre au point une solution de sildenafil facilement utilisable par voie intraveineuse. Dans un deuxième temps, l'administration de sildenafil par voie nébulisée sera tentée pour en documenter son effet en comparaison à la milrinone inhalée.

Chapitre V

Conclusion

Ce mémoire décrit l'utilisation de plusieurs modalités pharmacologiques différentes pour traiter la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires suivant la CEC. Tous les animaux ont été exposés au même protocole de CEC in vivo et les anneaux d'artères pulmonaires prélevés ont été soumis aux mêmes évaluations.

L'inhibition des phosphodiéstérases III et V améliore la fonction endothéliale des artères pulmonaires après la CEC en préservant la voie de production de NO affectée par la CEC. Les bénéfices hémodynamiques démontrés avec la milrinone inhalée sont probants, la destinant à un usage clinique à grande échelle.

La situation d'ischémie-reperfusion pulmonaire survenant lors de l'utilisation de la CEC est similaire à d'autres situations cliniques telle la greffe pulmonaire qui occasionne souvent une l'hypertension pulmonaire aigue avec des effets délétères sur la fonction ventriculaire droite. L'étude de la milrinone inhalée dans un modèle de transplantation permettrait de mieux caractériser la physiopathologie du phénomène d'ischémie-reperfusion et potentiellement d'offrir cette modalité thérapeutique à un plus grand nombre de patients.

Sources documentaires

-
- 1 Boulanger C, Vanhoutte PM. The endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. Servier, 1994.
 - 2 Demaria R, Fortier S, Bédard A, Sinquet JC, Albat A, Frapier JM, Perrault LP, Chaptal PA. La circulation extracorporelle, un extraordinaire outil qui n'est pas seulement au service du chirurgien cardiaque. In revision.
 - 3 Stewart DJ. Endothelial dysfunction in pulmonary vascular disorders. *Drug Res* 1994; 44 : 451-4.
 - 4 Furchgott RF, and Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
 - 5 Lüscher TF, Vanhoutte PM. The Endothelium : Modulator of Cardiovascular Function. CRC Press, Inc, Boca Raton 1990 : 1-228.
 - 6 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
 - 7 Pearson PJ and Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1993; 122: 1-67.
 - 8 Schini-Kerth VB and Vanhoutte PM. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Experimental Physiology* 1995; 80:885-905.
 - 9 Nishida K, Harrison DG, Navas JP et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90: 2092-2096.
 - 10 Taylor B, Alarcon L, Billiar T. Inducible nitric oxide synthase in the liver : regulation and function. *Biochemistry Moscow* 1998; 63 : 766-81
 - 11 Kone B. Localisation and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol.* 1999; 19 : 230-241
 - 12 Holtz F, Fostermann U, Pohl U et al. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs:

-
- effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6:1161-1169.
- 13 Bassenge E₂, Heuch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116:79-163.
 - 14 Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1145-H1149.
 - 15 Rubanyi GM. Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am J Physiol* 1988; 255:H783-H788.
 - 16 Rubanyi GM, Freay AD, Johns A et al. Elevated transmural pressure inhibits the release of EDRF by mechanism(s) similar to high K⁺ and barium. In: Mulvany MJ ed. *Resistance arteries, structure and function*. New-York: Elsevier. 1991;226-232.
 - 17 Furchgott RF, and Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-2018.
 - 18 Vanhoutte P.M. The endothelium - modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319(August 25): 512-513.
 - 19 Vanhoutte P.M. The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87(suppl V): V-9-V-17.
 - 20 Vanhoutte PM, and Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in Hypertension. *Hypertension Research -Clinical and Experimental-* 1995; 18:87-98.
 - 21 Vanhoutte PM and Scott-Burden T. The Endothelium in Health and Disease. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1):62-67.
 - 22 Vanhoutte PM and Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor(s) and coronary vasospasm. *Circulation* 1989; 80 (No. 1): 1-9.
 - 23 Vanhoutte PM, Gräser T and Lüscher TF. Endothelium-Derived Contracting Factors. In: *Endothelin*, Ed. Gabor Rubanyi, Oxford University Press, Oxford 1992; 3-16.

-
- 24 Vanhoutte PM. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets *Eur Heart J* 1991; 12(Supp. E): 25-32.
 - 25 Vanhoutte PM. State of the Art Lecture: Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13(No.6, Part 2):658-667.
 - 26 Vanhoutte PM, Boulanger CM, and Mombouli JV. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Converting Enzyme Inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76:3E-12E
 - 27 Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Nov;28(11):2233-40.
 - 28 Flavahan NA and Vanhoutte PM. G-Protein and Endothelial Responses. *Blood Vessels* 1990; 27:218-229
 - 29 Flavahan NA and Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and Endothelial Dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41S.
 - 30 Vanhoutte PM., Boulanger CM, and Mombouli JV. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Converting Enzyme Inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76:3E-12E
 - 31 Vanhoutte P.M. The endothelium - modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319(August 25): 512-513.
 - 32 Vanhoutte PM. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets *Eur Heart J* 1991; 12(Supp. E): 25-32.
 - 33 Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium : maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B* 1994 ; 348:225-246.
 - 34 Scott-Burden T and Vanhoutte PM. Regulation of Smooth Muscle Cell Growth by Endothelium-Derived Factors. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1):9
 - 35 Scott-Burden T and Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87(suppl.V):V-51-V-55.

-
- 36 VanderVliet A, Eiserich J, Cross C. Nitric oxide : a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res.* 2000; 1 : 67-72.
 - 37 Sanders D, Kelley T, Larson D. The role of nitric oxide synthase/ nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion* 2000; 15: 97-104
 - 38 Griffith O, Stuehr D. Nitric oxide synthases : properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57 : 707-36.
 - 39 Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43: 650-7
 - 40 Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Meth. Mol. Biol.* 1998; 100:1-32.
 - 41 Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. *Archives maladies du cœur et des vaisseaux* 1997; 90
 - 42 Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction : from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 61-74
 - 43 Taylor B, Alarcon L, Billiar T. Inducible nitric oxide synthases in the liver: regulation and function. *Biochem. Moscow*; 1998. 63: 734-743
 - 44 Mombouli J, Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:218-229.
 - 45 Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a double-edge sword? *Circulation* 1999; 99:2972-5.
 - 46 Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarisation of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93 : 3520-6
 - 47 Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acid as endothelium derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 1996; 78 : 415-23.
 - 48 Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-Proteins and Endothelial Responses. *Blood Vessels* 1990; 27:218-229.
 - 49 Lüscher T, Noll G. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:S16-S26

-
- 50 Carville C, Raffestin B, Eddahibi S, et al. Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: Effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:889-896.
 - 51 Lüscher T, Noll G. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:S16-S26.
 - 52 Olmos L, Mombouli JV, Illiano S, et al. cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am J Physiol* 1995; 268:H865-H870.
 - 53 Katzung B. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes & related compound. In Lange A, ed. *Basic and clinical pharmacology*, Vol. 7th edition. Stanford: Prentice Hall International, 1998. pp. 305-306.
 - 54 De Mey JG and Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. *Circ Res* 1982 ; 5:439-447.
 - 55 Lüscher TF, Vanhoutte PM. Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor. in "Endothelial cell dysfunction" edited by Simionescu N, Simionescu M. Plenum Press New York, NY. 1992; 65-102.
 - 56 Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364:45-56.
 - 57 Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986 ; 48:307-320.
 - 58 Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol* 1986; 250:H822-H827.

-
- 59 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yasaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
 - 60 Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 1992; 12(4):391-421
 - 61 Sakurai S, and Goto K. Endothelins. Vascular Actions and Clinical Implications. *Drugs* 1993; 46(5):795-804
 - 62 Schini VB and Vanhoutte PM. Endothelin-1: A potent Vasoactive Peptide. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69:1-7
 - 63 Vanhoutte PM. Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension ? *Hypertension* 1993; 21:747-751
 - 64 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 322, 411-415
 - 65 Arai H, Hori H, Aramori A, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732
 - 66 Haynes WH, Ferro OJ, O'Kane KPJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circ* 1996; 93 : 1860-70.
 - 67 Masaki T, Miwa S, Sawamura T, et al. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* 1999; 375 :133-8
 - 68 Vanhoutte P. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81:571-577
 - 69 Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S, al. e. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. *J Appl Physiol* 1994; 76:1976-1982
 - 70 Dupuis J, Goresky C, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81:1510-1515.

-
- 71 Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, et al. Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76:E3-E12.
 - 72 Dupuis J. Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics. *Can J Cardiol* 2000; 16(7):903-910.
 - 73 Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30: 293-331
 - 74 Lüscher TF, Cooke JP, Houston DS, et al. Endothelium dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc* 1987a ; 62 :601-606.
 - 75 Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, et al. Bradykinin induces generation of oxygen reactive species in bovine aortic endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*.1994; 84 : 301-14
 - 76 Griendling K, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander R. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: New concepts. *Hypertension* 1997; 29:213-239.
 - 77 Wattanapitayakul S, Weinstein D, Holycross B, Bauer J. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *Faseb* 2000; 14:271-278.
 - 78 Grossman W. Clinical measurement of vascular resistance and assessment of vasodilator drugs. In Grossman W, Baim D, eds. *Cardiac Catheterization, Angiography, and Intervention*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 1991. pp. 143-151.
 - 79 Lüscher T. Endothelial dysfunction : The role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart* 2000; 84 (Supp I): i20-i22.
 - 80 Shibano TJ, Godina L, Birnbaumer L, et al. Pertussis toxin-sensitive G-proteins in regenerated endothelial cells after balloon denudation in porcine coronary arteries. *Am J Physiol* 1994; 267: 979-81

-
- 81 Shimokawa H, Vanhoutte PM. Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 1197-202.
 - 82 Mora C, Guyton R, Rigatti R, Finlayson D. Cardiopulmonary bypass: principles and techniques of extracorporeal circulation. New York: Springer-Verlag, 1995.
 - 83 Frering B, Philip I, Dehoux M, et al. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108(4): 636-41
 - 84 Wan S, DeSmet JM, Barvais L, et al. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(3): 806-11
 - 85 Stahl RF, Fisher CA, Kucich U, et al. Effects of simulated extracorporeal circulation on human leukocyte elastase release, superoxide generation and procoagulant activity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101: 230-9
 - 86 Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, et al. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *New Engl J Med* 1981; 304: 497-503
 - 87 Boyle EM, Pohlman TH, Johnson MC, et al. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997; 63: 277-84.
 - 88 Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio Thor Surg* 2002; 21: 232-244.
 - 89 Asimakopoulos G. Systemic inflammation and cardiac surgery: An update. *Perfusion* 2001; 16: 353-60
 - 90 Edmunds LH. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: S12-6

-
- 91 Bruins P, Velthuis HT, Yazdanbakhsh AP, et al. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ* 1997; 96: 3542-8
 - 92 Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: S17-19.
 - 93 Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B, et al. Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *Am Heart J* 1992;123:37-45
 - 94 Cave AC, Manché A, Derias NW, et al. Thromboxane A2 mediates pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in the rabbit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ; 106:959-67.
 - 95 Byrne JG, Appleyard RF, Sun SC, et al. Cardiac derived thromboxane A2: an initiating mediator of reperfusion injury? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:689-93
 - 96 Jansen NJG, van Oeveren W, Gu YJ, et al. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 744-48
 - 97 Bvaue AE. The role of the gut in the development of multiple organ dysfunction in cardiothoracic patients. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 822-39
 - 98 Zhu ZG, Wang MS, Jiang Zb, et al. The dynamic change of plasma endothelin during the postoperative period in patients with rheumatic valvular disease and secondary pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108: 960-68
 - 99 Matheis G, Haak T, Beyersdorf F et al. Circulating endothelin in patients undergoing coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995; 9: 269-74.
 - 100 Rubin LJ, Barst RJ, Kaiser LR, et al. Primary pulmonary hypertension. ACCP Consensus Report. *Chest* 1993; 104:236.

-
- 101 Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992 Jul 9;327(2):70-5.
 - 102 Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993 Jun 17;328(24):1732-9.
 - 103 Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Engl J Med* 1995 Jul 27;333(4):214-21.
 - 104 Archer SL, Djaballah K, Humbert M, Weir KE, Fartoukh M, Dall'ava-Santucci J, Mercier JC, Simonneau G, Tuan Dinh-Xuan. A nitric oxide deficiency in fenfluramine- and dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Oct;158(4):1061-7.
 - 105 Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Jun;159(6):1925-32.
 - 106 Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002 Mar 5;105(9):1034-6.
 - 107 Yuan, XJ, Wang, J, Juhaszova, et al. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 351:726.
 - 108 Archer, S, Rich, S. Primary pulmonary hypertension: A vascular biology and translational research "work in progress". *Circulation* 2000 Nov 28;102:2781.
 - 109 Stevens LM, El-Hamamsy I, Carrier M, et al. Effect of tetrahydropterin for coronary endothelial dysfunction induced by cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. In revision.

-
- 110 Fortier S, Demaria R, Malo O, et al. Cardiopulmonary bypass induces a selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. In revision.
 - 111 Gagnon J, Malo O, Desjardins N, et al. Ventilation prevent pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass. *Eur J Thorac Cardiovac Surg*. In revision.
 - 112 Fortier S, Demaria R, Malo O, et al. Pulmonary endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg*. In revision
 - 113 Sato K, Jianyi L, Metais C, et al. Increased pulmonary vascular contraction to serotonin after cardiopulmonary bypass: role of cyclooxygenase. *J Surg Research* 2000; 90: 138-143.
 - 114 Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, et al. Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1775-80.
 - 115 Nyhan D, Gaine S, Hales M, et al. Pulmonary vascular endothelial responses are differentially modulated after cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 518-25
 - 116 Mora C, Guyton R, Rigatti R, et al. *Cardiopulmonary Bypass: Principles and techniques of extracorporeal circulation*. New York: Springer-Verlag; 1995.
 - 117 Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and critical trial coordination. *Am J Respi Crit Care Med* 1994; 149: 818-24
 - 118 Gott JP, Cooper WA, Schmidt FE Jr, et al. Modifying risk for extracorporeal circulation: trial of four antiinflammatory strategies. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 747-54.
 - 119 Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13: 50-68.

-
- 120 Chai PJ, Williamson JA, Lodge AJ, et al. Effects of ischemia on pulmonary dysfunction after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000; 67(3): 337-8.
 - 121 Moraes D, Colucci W, Givertz M. Secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure: The role of endothelium in pathophysiology and management. *Circ* 2000;102:1718-23
 - 122 Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981; 301: 497-502.
 - 123 Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, et al. C5a-induced of P-selectins in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 1147-55.
 - 124 Gillinov AM, De Valeria PA, Winkelstein JA, et al. Complement inhibition with soluble complement receptor type 1 in cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 619-24.
 - 125 Weiss SJ, Tissue destruction By neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320: 365-76
 - 126 Tonz M, Mihaljevic T, von Segesser Lk, Fehr J, Schmid ER, Turina M. Acute lung injury during cardiopulmonary bypass. Are neutrophils responsible? *Chest* 1995; 108: 1551-6
 - 127 Hashimoto K, Miyamoto H, Suzuki K, et al. Evidence of organ damage after cardiopulmonary bypass. the role of elastase and vasoactive mediators. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104: 666-73.
 - 128 Jorens PG, Van Damma J, De Baker W, et al. Interleukin-8 in the broncho-alveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome and the patients at risk for ARDS. *Cytokine* 1992; 4: 592-7.
 - 129 Johnson D, Thompson D, Hurst T, et al. Neutrophil-mediated acute lung injury after extracorporeal perfusion. *J Thorac Cardiovas Surg* 1994; 107: 1193-1202.

-
- 130 Dreyer WJ, Michael LH, Millman EE, et al. Neutrophil sequestration and pulmonary dysfunction in a canine model of open heart surgery with cardiopulmonary bypass. *Circ* 1995; 1992: 2276-83.
 - 131 Brix-Christensen V, Tonnesen E, Hjortdal VE, et al. Neutrophil and platelet accumulates in the heart, lungs and kidneys after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Crit Care Med* 2002; 30: 670-76.
 - 132 Ito H, Hamano K, Gohra H, et al. Relationship between respiratory distress and cytokine response after cardiopulmonary bypass. *Surg Today* 1997; 27(3): 220-25.
 - 133 Massoudy P, Zahler S, Becker BF, et al. Evidence for inflammatory responses of the lungs during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Chest* 2001; 119: 31-36.
 - 134 Friedman M, Sellke F, Wang SY, et al. Parameters of pulmonary injury after total or partial pulmonary bypass. *Circ* 1994; 90: 262-268.
 - 135 Friedman M, Wang SY, Sellke F, et al. Pulmonary injury after total or partial cardiopulmonary bypass with thromboxane synthesis inhibition. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 598-603.
 - 136 Gagnon J, Malo O, Desjardins N, et al. Ventilation and NO inhalation prevent pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass. Presented at the 37th Annual Meeting of the Society of Thoracic Surgeons, New Orleans, LA, Jan 29-31, 2001.
 - 137 Magnusson L, Zemgulis V, Tenling A, et al. Use of a vital capacity maneuver to prevent atelectasis after CPB. *Anesthesiology* 98; 88:134-42.
 - 138 Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner K, et al. Continuous positive airway pressure at 10 cm H₂O during cardiopulmonary bypass improves postoperative gas exchange. *Anesth Analg* 2000; 91: 522-7
 - 139 Loer SA, Kalweit G, Tarnow J. Effects of ventilation and non-ventilation on pulmonary venous blood gases and markers of lung

-
- hypoxia in humans undergoing total cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 2000; 28: 1336-40.
- 140 Serraf A, Robotin M, Bonnet N, et al. Alteration of the neonatal pulmonary physiology after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114(6):1061-9.
- 141 Liu Y, Wang Q, Zhu X, et al. Pulmonary artery perfusion with protective solution reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1402-7
- 142 Richter JA, Meisner H, Tassani P, et al. Drew-Anderson technique attenuates systemic inflammatory response syndrome and improves respiratory function after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2000; 69(1): 77-83.
- 143 Fortier S, Demaria RG, Malo O, et al. Inhaled prostacyclin and pulmonary endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg*. Article in revision.
- 144 Haché M, Denault A, Bélisle S, et al. Inhaled epoprostenol and pulmonary hypertension before cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 642-9.
- 145 Maxey TS, Smith CD, Kern JA, et al. Beneficial effects of inhaled nitric oxide in adult cardiac surgical patients. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 529-33
- 146 Lowson SM. Inhaled alternatives to nitric oxide. *Anesthesiology* 2002; 96: 1504-13.
- 147 Haraldson A, Kieler-Jensen N, Ricksten S. The additive pulmonary vasodilator effects of inhaled prostacyclin and inhaled milrinone in postcardiac surgical patients with pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2001; 93: 1439-45.
- 148 Kawashima M, Nakamura T, Schneider S, et al. Iloprost ameliorates ischemia-reperfusion injury by reduction of endothelin-1 release. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(1): 133

-
- 149 Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(8): 1098-102.
 - 150 Ichinose F, Erana-Garcia J, Hromi J, et al. Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2001; 29(5): 1000-5.
 - 151 Michelakis E, Tymchak W, Lien D, et al. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002; 105(20) 2398-403
 - 152 Zhao L, Mason NA, Morrel NW, et al. Sildenafil inhibits hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 424-8.
 - 153 Kleinsasser A, Lockinger A, Hoermann C, et al. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(2): 339-43.
 - 154 Fuminobu I, Beppu S, Hamada T, et al. Effects of sildenafil citrate combined with nitrates on the heart. *Circulation* 2000; 102: 2516-21.
 - 155 Traverse JH, Chen YJ, Du R, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. *Circulation* 2000; 102: 2997-3002
 - 156 Przyklenk K, Kloner RA. Sildenafil citrate does not exacerbate myocardial ischemia in canine models of coronary artery stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 286-92
 - 157 Haraldsson A, Kieler-Jensen N, Rickson SE. The additive pulmonary vasodilatory effects of inhaled prostacyclin and inhaled milrinone in postcardiac surgery patients with pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2001; 93: 1439-45.
 - 158 Downing SW, Edmunds LH Jr. Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1992;54:1236-43.

-
- 159 Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR, McCormack LJ. Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance. *Cleve Clin Q.* 1958;25:65-83.
- 160 Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest.* 1997;112:676-92. 4.
- 161 Davila-Roman VG, Waggoner AD, Hopkins WE, Barzilai B. Right ventricular dysfunction in low output syndrome after cardiac operations: assessment by transesophageal echocardiography. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:1081-6.
- 162 Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci.* 2000;320:223-32
- 163 Downing SW, Edmunds LH Jr. Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1992;54:1236-43.
- 164 Fortier S, Demaria R, Malo O, et al. Cardiopulmonary bypass induces a selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* In press.
- 165 Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(8): 1098-102.
- 166 Michelakis E, Tymchak W, Lien D, et al. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002; 105(20) 2398-403
- 167 Zhao L, Mason NA, Morrel NW, et al. Sildenafil inhibits hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 424-8.
- 168 Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(8): 1098-102.

-
- 169 Fuminobu I, Beppu S, Hamada T, et al. Effects of sildenafil citrate combined with nitrates on the heart. *Circulation* 2000; 102: 2516-21
 - 170 Traverse JH, Chen YJ, Du R, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. *Circulation* 2000; 102: 2997-3002
 - 171 Przyklenk K, Kloner RA. Sildenafil citrate does not exacerbate myocardial ischemia in canine models of coronary artery stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 286-92
 - 172 Scheeren T, Radermacher P. Prostacyclin (PGI₂): new aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. *Intensive Care Med.* 1997;23:146-58.
 - 173 Haché M, Denault AY, Belisle S, Couture P, Babin D, Tetrault F, et al. Inhaled prostacyclin (PGI₂) is an effective addition to the treatment of pulmonary hypertension and hypoxia in the operating room and intensive care unit. *Can J Anaesth.* 2001;48:924-9.
 - 174 Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Sherman MP, Ignarro LJ. Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1996;61:1775-80.
 - 175 Riedel B. The pathophysiology and management of perioperative pulmonary hypertension with specific emphasis on the period following cardiac surgery. *Int Anesthesiol Clin.* 1999;37:55-79
 - 176 Davila-Roman VG, Waggoner AD, Hopkins WE, Barzilai B. Right ventricular dysfunction in low output syndrome after cardiac operations: assessment by transesophageal echocardiography. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1081-6.
 - 177 Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Sherman MP, Ignarro LJ. Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1996;61:1775-80

-
- 178 Shafique T, Johnson R, Dai HB, Weintraub R, Sellke F. Altered pulmonary microvascular reactivity after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:479-86.
 - 179 Gagnon J, Malo O, Desjardins N, et al. Ventilation during cardiopulmonary bypass prevent pulmonary endothelial dysfunction. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg.* In revision.
 - 180 Shafique T, Johnson R, Dai HB, Weintraub R, Sellke F. Altered pulmonary microvascular reactivity after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:479-86
 - 181 Serraf A, Sellak H, Hervé P, Bonnet N, Robotin M, Detruit H, et al. Vascular endothelium viability and function after total cardiopulmonary bypass in neonatal piglets. *Am J Resp Crit Care Med.* 1999;159:544-51
 - 182 Nyhan D, Gaines S, Hales M, Zanaboni P, Simon B, Berkowitz D, et al. Pulmonary vascular endothelial responses are differentially modulated after cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34:518-25
 - 183 Kirklin JK, McGiffin DC. Control of the inflammatory response in extended myocardial preservation of the donor heart. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:1978-82.
 - 184 Ratych R, Chuknyiska R, Bulkley G. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery.* 1987;102:122-31
 - 185 Seccombe J, Schaff H. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:778-88.
 - 186 Gagnon J, Malo O, Desjardins N, et al. Ventilation during cardiopulmonary bypass prevent pulmonary endothelial dysfunction. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg.* In revision
 - 187 Schwinn DA, McIntyre RW, Hawkins ED, Kates RA, Reves JG. Alpha-1 adrenergic responsiveness during coronary artery bypass surgery: effect of preoperative ejection fraction. *Anesthesiology.* 1988;69:206-17.

-
- 188 Liu SF, Barnes PJ. Role of endothelium in the control of pulmonary vascular tone. *Endothelium*. 1994;2:11-33
 - 189 Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR, McCormack LJ. Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance. *Cleve Clin Q*. 1958;25:65-83.
 - 190 Ng CS, Wan S, Yim AP, Arifi AA. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. *Chest*. 2002;121:1269-77
 - 191 Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*. 1997;112:676-92. 4.
 - 192 Boyle EM Jr, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:277-84
 - 193 Davila-Roman VG, Waggoner AD, Hopkins WE, Barzilai B. Right ventricular dysfunction in low output syndrome after cardiac operations: assessment by transesophageal echocardiography. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:1081-6
 - 194 Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci*. 2000;320:223-32
 - 195 Fortier S, Demaria R, Malo O, et al. Cardiopulmonary bypass induces a selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg*. In revision.
 - 196 Haraldsson A, Kieler-Jensen N, Ricksen SE. The additive pulmonary vasodilatory effects of inhaled prostacyclin and inhaled milrinone in postcardiac surgery patients with pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2001; 93: 1439-45.
 - 197 Cuffe MS, Califf RM, Adams KF, Jr., Benza R, Bourge R, Colucci WS, Massie BM, O'Connor CM, Pina I, Quigg R, Silver MA, Gheorghiade M: Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic

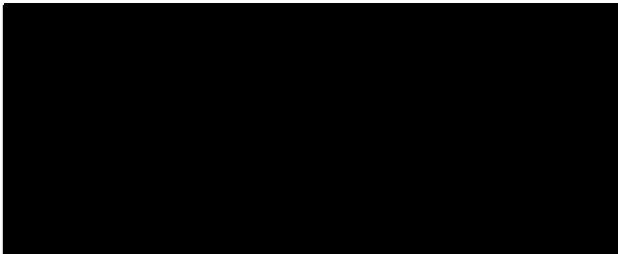
-
- heart failure: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 2002; 287:1541-7
- 198 Riedel B. The pathophysiology and management of perioperative pulmonary hypertension with specific emphasis on the period following cardiac surgery. *Int Anesthesiol Clin.* 1999;37:55-79.
- 199 Reichert CL, Visser CA, Koolen JJ, et al. Transesophageal echocardiography in hypotensive patients after cardiac operations. Comparison with hemodynamic parameters. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:321-6.
- 200 Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Sherman MP, Ignarro LJ. Pulmonary vasoconstriction due to impaired nitric oxide production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1996;61:1775-80.
- 201 Riedel B. The pathophysiology and management of perioperative pulmonary hypertension with specific emphasis on the period following cardiac surgery. *Int Anesthesiol Clin.* 1999;37:55-79.
- 202 Haraldsson A, Kieler-Jensen N, Rickson SE. The additive pulmonary vasodilatory effects of inhaled prostacyclin and inhaled milrinone in postcardiac surgery patients with pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2001; 93: 1439-45
- 203 Fortier S, Demaria R, Malo O, et al. Cardiopulmonary bypass induces a selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries. *Eur J Thorac Cardiovasc Surg.* In revision.
- 204 Niwano K, Arai M, Tomaru K et al. Transcriptional stimulation of the eNOS gene by the stable prostacyclin analogue Beraprost is mediated through cAMP-responsive element in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 2003; 93: 523-530
- 205 Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner K, et al. Continuous positive airway pressure at 10 cm H₂O during cardiopulmonary bypass improves postoperative gas exchange. *Anesth Analg* 2000; 91: 522-7

-
- 206 Magnusson L, Zemgulis V, Wicky S, Tyden H, Hedenstierna G. Effect of CPAP during cardiopulmonary bypass on postoperative lung function. An experimental study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42:1133-8.

Montréal, le 18 décembre 2003

Aux membres du jury,

Les deux articles présentés par Yoan Lamarche dans son mémoire de maîtrise intitulés: *Intravenous sildenafil prevents the pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass* et *Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following CPB*, ont été écrits par Yoan Lamarche. La planification, les expérimentations, l'analyse des résultats et la présentation de ceux-ci ont été accomplis par Yoan Lamarche. Les coauteurs ont contribué en tant qu'assistants ou conseillers à certaines manipulations, à l'analyse des résultats et à l'élaboration des manuscrits.



Louis P. Perrault, MD, PhD.
Directeur de recherche

28/1/2004
Date jj/mm/aaaa

Montréal, le 8 janvier 2004

Lettre d'accord des coauteurs

Pour Yoan Lamarche
Étudiant à la Maîtrise en Sciences Biomédicales
Faculté de médecine, Université de Montréal

Aux membres du jury,

J'accepte que le manuscrit:

Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following CPB

Yoan Lamarche, MD. Malo O, MSc. Éric Thorin, PhD. André Denault, MD. Michel Carrier, MD. Julie Roy, CPP. Louis P. Perrault, MD, PhD

devant être soumis à la revue *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* soit inclus dans le mémoire de Yoan Lamarche qui a pour titre: *Nouvelles approches thérapeutiques pour la dysfonction endothéliale et l'hypertension pulmonaire secondaire à la circulation extracorporelle chez le porc* en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise en Sciences Biomédicales. J'accepte aussi, le cas échéant, que le mémoire soit indexé et diffusé.

14/01/04

9. J. 2004

Montréal, le 8 janvier 2004

Lettre d'accord des coauteurs

Pour Yoan Lamarche
Étudiant à la Maîtrise en Sciences Biomédicales
Faculté de médecine, Université de Montréal

Aux membres du jury,

J'accepte que le manuscrit:

**Intravenous sildenafil prevents the pulmonary endothelial dysfunction
due to cardiopulmonary bypass.**

Yoan Lamarche, MD. André Denault, MD. Michel Carrier, MD. Julie Roy, CCP Louis P.
Perrault, MD, PhD

devant être soumis à la revue *Annals of Thoracic Surgery* soit inclus dans le mémoire de
Yoan Lamarche qui a pour titre: *Nouvelles approches thérapeutiques pour la dysfonction
endothéliale et l'hypertension pulmonaire secondaire à la circulation extracorporelle
chez le porc* en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise en Sciences Biomédicales.
J'accepte aussi, le cas échéant, que le mémoire soit indexé et diffusé.

